

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf F. Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Molekulargenetische Studien bei Patienten mit Gitelman-Syndrom

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Maximilian Johannes Swoboda

aus

Kronberg im Taunus

Marburg, 2017

angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
16.05.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Günter Klaus

Korreferent: Prof. Dr. Timothy David Plant

Für Barbara und Hans-Jürgen Swoboda

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Einführung	6
1.2	Physiologie der Niere	6
1.3	Salzverlusterkrankungen der Niere	6
1.4	Antenatales Bartter-Syndrom (aBS)	7
1.5	Klassisches Bartter-Syndrom (cBS)	8
1.6	Bartter-Syndrom mit Taubheit (BSND)	9
1.7	Gitelman-Syndrom (GS)	10
1.7.1	Pathogenese und molekulargenetische Grundlagen des Gitelman-Syndroms (GS)	11
1.7.2	Klinische Symptomatik des Gitelman-Syndroms	15
1.8	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	18
2	Material und Methoden	23
2.1	Patientenkollektiv.....	23
2.2	Materialien	26
2.2.1	Geräte und Hilfsmittel.....	26
2.2.2	Chemikalien und Reagenzien	27
2.3	Methoden.....	28
2.3.1	Gelelektrophoresen	28
2.3.1.1	Beschreibung.....	28
2.3.1.2	Material	29
2.3.1.3	Durchführung	30
2.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	31
2.3.2.1	Beschreibung.....	31
2.3.2.2	Amplification-refractory-mutation-system-PCR (ARMS-PCR) ...	32
2.3.2.3	Material	34
2.3.2.4	Durchführung	35
2.3.3	Kopplungsanalyse per Mikrosatelliten-Polymorphismen.....	36
2.3.3.1	Beschreibung.....	36
2.3.3.2	Material	39
2.3.3.3	Durchführung	40
2.3.3.4	Auswertung.....	41

2.3.4	Single strand confirmation polymorphism (SSCP)	42
2.3.4.1	Beschreibung	42
2.3.4.2	Material	44
2.3.4.3	Durchführung	45
2.3.4.4	Auswertung	46
2.3.5	DNA-Sequenzierung	47
2.3.5.1	Beschreibung	47
2.3.5.2	Material	48
2.3.5.3	Durchführung	49
2.3.5.4	Auswertung	50
2.4	Statistik	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Mutationsanalyse	51
3.2	Detaillierte Haplotypisierung	52
4	Diskussion	59
5	Zusammenfassung	66
6	Englische Zusammenfassung	68
7	Literaturverzeichnis	69
8	Anhang	81
8.1	Mutationsübersicht	81
8.2	Abkürzungsverzeichnis	83
8.3	Abbildungsverzeichnis	86
8.4	Tabellenverzeichnis	87
8.5	Verzeichnis der akademischen Lehrer	88
8.6	Danksagung	90

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Einleitung gibt einen Überblick über die wichtigsten Aspekte des Gitelman-Syndroms (GS) und verwandter Krankheitsbilder. Dabei werden geschichtliche Aspekte, pathophysiologische Mechanismen sowie die Klinik dieser Salzverlusttubulopathien erläutert.

1.2 Physiologie der Niere

Die Hauptaufgabe der Niere ist die Bildung des Harns durch Filtration, Konzentration und Reabsorption. Die systemische Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts als auch die Regulation des Säure-Basen-Haushalts erfolgt durch tubuläre Reabsorption und Sekretion. Die Prozesse der Elektrolyt- und Wasserreabsorption unterscheiden sich je nach beteiligtem Tubulusabschnitt. Diese Regulationsmechanismen erfolgen in unterschiedlichen Abschnitten entlang des Nephrons.

1.3 Salzverlusterkrankungen der Niere

Entlang des Nierentubulus wird ein Großteil der in den Glomeruli gefilterten Elektrolyt- und Wassermengen rückresorbiert. Hierfür existieren je nach Tubulusabschnitt unterschiedliche Transportmechanismen. Störungen der Elektrolyt- und Wasserreabsorption führen daher je nach betroffenem Tubulusabschnitt zu charakteristischen Krankheitsbildern. Bei den häufig unter dem Begriff Bartter-Syndrom (BS) zusammengefassten Krankheitsbildern handelt es sich um eine Gruppe hereditärer Erkrankungen, denen ein gestörter Salztransport im distalen Tubulus zugrunde liegt. Dieser führt durch den Versuch der Niere, den Salzverlust in späteren Tubulusabschnitten zu kompensieren, zu einer Aktivierung des Renin-Aldosteron-Systems mit nachfolgender Hypokaliämie und Alkalose.

Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen, erblich bedingten Salzverlustkrankungen der Niere sind sowohl in ihrem klinischen als auch genetischen Erscheinen sehr heterogen. Gemeinsam ist ihnen ein gestörter transepithelialer Kochsalztransport entlang verschiedener Abschnitte des distalen Nephrons. Wissenschaftliche Publikationen konnten Mutationen in mehreren Genen als zugrundeliegende genetische Defekte identifizieren. In den meisten Fällen kodieren diese Gene für im Tubulusepithel exprimierte Ionentransportproteine, die zum Teil auch Angriffspunkte von Diuretika darstellen. Treten diese Defekte im Bereich der Henle'schen Schleife auf, führen sie zu verschiedenen Formen des Bartter-Syndroms (antenatales Bartter-Syndrom, klassisches Bartter-Syndrom, Bartter-Syndrom mit Taubheit). Bereits in der Säuglingszeit manifestieren sich diese Erkrankungen mit einem deutlichen Salzverlust und einer Polyurie.

Mit Hilfe molekulargenetischer Analysen war es in den letzten Jahrzehnten möglich, die genetischen Grundlagen der verschiedenen Formen der unter dem Begriff „Bartter-Syndrom“ zusammengefassten Salzverlusttubulopathien aufzuklären. Klinisch und genetisch lassen sich vier Unterformen einteilen.

Um die klinischen und laborchemischen Unterschiede der verschiedenen Formen zu verdeutlichen, sollen im Folgenden kurz die verschiedenen Untergruppen beschrieben werden.

1. antenatales Bartter Syndrom (aBS) (auch Hyperprostaglandin-E-Syndrom (HPS) genannt)
2. klassisches Bartter-Syndrom (cBS)
3. antenatales Bartter Syndrom mit Taubheit (BSND)
4. Gitelman-Syndrom (GS)

1.4 Antenatales Bartter-Syndrom (aBS)

Das aBS wird verursacht durch Mutationen im *SLC12A1*-Gen oder im *KCNJ1*-Gen. Diese kodieren für den Na-K-2Cl-Kotransporter NKCC2 und den Kaliumkanal ROMK (Simon, D. B. *et al.*, 1996; Derst *et al.*, 1997). NKCC2 und

ROMK sind an der aktiven Rückresorption von NaCl im dicken aufsteigenden Teil (TAL) der Henle'schen Schleife beteiligt (Greger, 1996). Der NKCC2 sorgt dabei für die Aufnahme von NaCl an der apikalen Membran der Tubulusepithelzellen. Der Kaliumkanal ROMK ermöglicht ein „Recycling“ des zusammen mit dem NaCl in die Zelle aufgenommenen Kaliums und hält so die Reabsorption von NaCl via NKCC2 aufrecht.

Beim aBS wird durch den Defekt der aktiven transzellulären NaCl-Reabsorption sekundär auch der passive parazelluläre Transport von Kalzium beeinträchtigt, wodurch bei den betroffenen Patienten eine Hyperkalziurie und Nephrokalzinose entsteht. Das aBS manifestiert sich, wie der Name schon sagt, bereits pränatal durch Ausbildung eines Polyhydramnions infolge einer fetalen Polyurie im 2. Schwangerschaftstrimenon (Fanconi *et al.*, 1971; Seyberth *et al.*, 1985; Jeck *et al.*, 2001).

Postnatal fallen die betroffenen Patienten durch einen ausgeprägten Salz- und Wasserverlust auf (Mccredie *et al.*, 1974; Leonhardt *et al.*, 1992; Shoemaker *et al.*, 1993). Laborchemisch kommt es zur Ausbildung der typischen hypokaliämischen Alkalose. Sie entsteht durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), die einen Versuch der Niere darstellt, die Salz- und Wasserverluste in der Henle'schen Schleife in späteren Tubulusabschnitten zu kompensieren. Neben einer Gedeihstörung infolge exzessiver Wasser- und Elektrolytverluste, können auch Übelkeit, Erbrechen und rekurrentes Fieber auftreten. Sie stellen ein klinisches Korrelat einer bei aBS-Patienten erhöhten renalen Prostaglandin E₂-Synthese dar (Clive, 1995; Seyberth *et al.*, 1998; Jeck *et al.*, 2001). Therapeutisch kommen neben der Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution daher auch Cyclooxygenase-Hemmer zur Verminderung der Prostagandin-Synthese zur Anwendung (Seidel *et al.*, 1995; Mackie *et al.*, 1996; Seyberth *et al.*, 1998).

1.5 Klassisches Bartter-Syndrom (cBS)

Das cBS wird durch Mutationen im *CLCNKB*-Gen verursacht (Simon *et al.*, 1997). Dieses Gen kodiert für den renalen Chloridkanal ClC-Kb, der eine

bedeutende Rolle bei der tubulären Chloridreabsorption spielt, indem er an der basolateralen Membran der Tubuluszellen im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL, thick ascending limb) und im distalen Konvolut (DCT, distal convoluted tubule) eine Ausschleusung des apikal resorbierten Chlorids in das Interstitium ermöglicht. Patienten mit cBS fallen meist im Laufe des ersten Lebensjahres mit einer Gedeihstörung auf. Laborchemisch besteht neben der hypokaliämischen Alkalose meist eine ausgeprägte Hypochlorämie. Daneben sind aber auch Fälle beschrieben, die erst deutlich später klinische Symptome entwickeln, die den unten näher beschriebenen Symptomen des GS ähneln. Diese Patienten weisen laborchemisch die an sich für das GS pathognomonische Laborkonstellation einer Hypokaliämie und Hypomagnesiämie bei gleichzeitig verringerter Kalziumausscheidung (Hypokalziurie) auf. Das klinische Spektrum des cBS ist also sehr variabel. Es reicht von Verläufen, die dem aBS ähneln mit Polyhydramnion, Frühgeburtlichkeit, ausgeprägterem Salzverlust sowie auch Hyperkalziurie und Entwicklung einer Nephrokalzinose bis zum klinischen und laborchemischen Bild eines GS.

Therapeutische Bausteine sind der Ausgleich des Salz- und Flüssigkeitshaushalts, eine Kaliumsubstitution und auch die Hemmung der Prostaglandinbildung. Einige Patienten erfordern auch eine höher dosierte Substitution von Magnesium.

1.6 Bartter-Syndrom mit Taubheit (BSND)

Diese Untergruppe des Bartter-Syndroms wird ebenfalls autosomal-rezessiv vererbt. Als Ursache konnten inaktivierende Mutationen im *BSND*-Gen identifiziert werden, das für das Protein Barttin kodiert (Birkenhäger et al. 2001). Folgende funktionelle Analysen konnten zeigen, dass Barttin eine essentielle Untereinheit der beiden Chloridkanäle CLC-Ka und CLC-Kb ist, die sowohl den Transport an die Zelloberfläche (Trafficking), als auch die Chloridleitfähigkeit der beiden Chloridkanäle beeinflusst (Estevez et al. 2001, (Fischer *et al.*, 2010). Die beiden Chloridkanäle CLC-Ka und CLC-Kb sind für die tubuläre Chloridreabsorption in TAL und DCT essentiell. Daneben sind sie auch im

Innenohr im Bereich der basolateralen Membran der Stria vascularis und an der Basis der Crista ampullaris, exprimiert (Birkenhäger *et al.*, 2001).

Der funktionelle Defekt beider basolateral lokalisierten Chloridkanäle führt zu renalen Wasser- und Salzverlusten, die noch ausgeprägter sein können als bei Patienten mit aBS. Therapeutisch steht eine intensive parenterale Flüssigkeitssubstitution im Mittelpunkt. Eine Therapie mit Cyclooxygenasehemmern zeigt nur ein geringes Ansprechen. Leider führt die Erkrankung bei vielen Patienten zur Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz. Ein Großteil der Kinder weist eine signifikante Wachstumsretardierung und eine verzögerte Entwicklung motorischer Fähigkeiten auf. Zusätzlich führt die gestörte Chloridkanalfunktion durch Beeinträchtigung der Elektrolytzusammensetzung der Endolympe zu einer Innenohrtaubheit.

1.7 Gitelman-Syndrom (GS)

Das Gitelman-Syndrom ist die häufigste Form der Salzverlusttubulopathien mit Hypokaliämie und Alkalose. Die Prävalenz wird auf ~1:40.000-50.000 geschätzt, mit wiederum einer Prävalenz von heterozygoten Trägern in der kaukasischen Bevölkerung von fast 1%. Das Krankheitsbild wurde 1966 von Gitelman und Kollegen erstbeschrieben, denen drei Patientinnen mit kombinierter Hypokaliämie und Hypomagnesiämie aufgefallen waren (Gitelman *et al.*, 1966). Die genauere klinische und laborchemische Charakterisierung weiterer Patienten zeigte einen nur milden renalen NaCl-Verlust, eine weitgehend erhaltene Konzentrationsfähigkeit der Nieren, jedoch die auch für die weiter oben genannten Formen des Bartter-Syndroms typische metabolische Alkalose. Die Werte für Renin und Aldosteron sind bei Patienten mit GS nur mäßig erhöht (Jeck *et al.*, 2000). Darüber hinaus fiel im Gegensatz zur Hyperkalziurie, die vor allem beim aBS zur Ausbildung einer Nephrokalzinose führt, eine verminderte Kalziumausscheidung (Hypokalziurie) auf, die zunächst als pathognomonisch für das GS angesehen wurde (Bettinelli *et al.*, 1992). Die Diagnose des GS stützt sich daher auf diese sogenannte Dissoziation von renalem Magnesium- und Kalziumtransport, die dann zu den

gegenläufigen Befunden von Hypomagnesiämie und Hypokalziurie führt (Bettinelli *et al.*, 1992). Ebenso wie die beschriebene Hypomagnesiämie ist die Entstehung der Hypokalziurie beim GS jedoch nach wie vor nicht abschließend geklärt. Neuere Studien gehen von einer gesteigerten proximal tubulären Kalzium-Reabsorption aus, die bei volumen-depletierten Patienten parallel zu einer gesteigerten Wasserreabsorption erfolgt (Nijenhuis *et al.*, 2005).

Tabelle 1: Klinische Symptomatik und biochemische Konstellation von aBS, cBS, BSND und GS im Vergleich

	aBS	cBS	BSND	GS
<i>klinische Symptomatik</i>				
Erstsymptomateintritt	pränatal	Säuglingszeit	pränatal	Kindes- und Erwachsenenalter
Dysmorphie	+	+/-	+	-
Entwicklungsverzögerung	+	+/-	+	-
Wachstumsretardierung	+	+/-	+	-
Polydipsie	+	+	+	+/-
Tetanien / Muskelkrämpfe	-	-	-	+/-
Muskelschwäche	-	-	+	+/-
Polyurie	+	+	+	+/-
Nephrokalzinose	+	+/-	-	-
sensorische Taubheit	-	-	+	-
Chondrokalzinose	-	-	-	+/-
Polyhydramnion	+	-	+	-
<i>biochemische Konstellation</i>				
Renin, Aldosteron	↑	↑	↑	normal / ↑
Prostaglandin E im Urin	↑↑↑	↑	↑↑↑	normal
Calcium im Urin	↑↑↑	normal / ↑	normal	↓
Magnesium im Serum	normal / niedrig-normal	in 20% d. F. ↓	normal	in 100% d. F. ↓
metabolische Alkalose	+	+	+	+
Kalium im Serum	↓	↓	↓	↓
Chlorid im Serum	↓	↓	↓	↓

1.7.1 Pathogenese und molekulargenetische Grundlagen des Gitelman-Syndroms (GS)

Das GS wird ebenso wie die zuvor beschriebenen Formen des BS autosomal-rezessiv vererbt. Ihm liegen inaktivierende Mutationen im *SLC12A3*-Gen zugrunde, das für den NaCl-Cotransporter NCCT kodiert. Dieser vermittelt als

integrales Membranprotein im DCT die aktive, nicht-elektrogene Kochsalzaufnahme in die Tubuluszelle. Er ist an der apikalen Membran der Tubuluszellen exprimiert und pharmakologisch Angriffspunkt der Thiaziddiuretika (Riveira-Munoz, Chang, Godefroid, *et al.*, 2007). Im DCT werden ca. 7% des filtrierten Natriumchlorids reabsorbiert (Yang *et al.*, 1996).

Das *SLC12A3*-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 16 lokalisiert (Genlokus: 16q13) und umfasst 48 kb genomischer Sequenz mit 26 Exons. Das kodierte NCCT-Protein besteht aus 1021 Aminosäuren mit 12 putativen transmembranären Domänen und einem langen zytosolischen C-Terminus (Abbildung 2).

Mittlerweile sind mehr als 400 verschiedene Mutationen im *SLC12A3*-Gen beschrieben (HGMD, Human Gene Mutation Database, www.hgmd.cf.co.uk). Missense-Mutationen machen dabei einen signifikanten Anteil von ca. 70% der Mutationen aus (Nakhoul *et al.*, 2012a). Neben zahlreichen Einzelfallberichten und kleineren Patientenkohorten wurden in den letzten Jahren drei große Studien publiziert, die Mutationsanalysen zusammen mit klinischen Daten bei großen Kohorten von insgesamt mehr als 750 Patienten beschreiben ((Ji *et al.*, 2008) (n=148); (Vargas-Poussou *et al.*, 2011) (n=448); (Glaudemans *et al.*, 2012) (n=163). Insbesondere diese großen Studien erlauben eine umfassende Beurteilung des genotypischen wie auch phänotypischen Spektrums des GS.

Tabelle 2: Gegenüberstellung detektierter mutierter Allele und verschiedener Mutationen von drei großen Studien der letzten Jahre

Studie	Patienten (n)	detektierte mutierte Allele (n,%)	verschiedene Mutationen (n)
Ji et al. 2008	148	196 (66%)	62
Vargas-Poussou et al. 2011	448	721 (80%)	172
Glaudemans et al. 2011	163	303 (93%)	114

Auch in diesen drei Studien machen Missense-Mutationen, d.h. Mutationen, die zum Austausch einer singulären Aminosäure im NCCT-Protein führen, die

Mehrzahl der detektierten Mutationen aus. Dabei ist das Spektrum von Missense-Mutationen beim GS sehr groß und betrifft mindestens ~220 verschiedene Aminosäure-Residuen (Glaudemans *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu trunkierenden Mutationen, die zu einem verkürzten und in aller Regel funktionslosen Proteinprodukt führen, ist die Konsequenz einer einzelnen Missense-Mutation ohne funktionelle Daten nur bedingt vorherzusagen. Neben öffentlich verfügbaren Vorhersage-Programmen (z.B. Polyphen2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), die versuchen, mittels verschiedener Algorithmen die Pathogenität einer Sequenzvariante einzuschätzen, spielen daher funktionelle Untersuchungen in-vitro eine wichtige Rolle. Allerdings existieren bislang nur für eine begrenzte Anzahl von NCCT-Varianten funktionelle Daten. Meist handelt es sich um Untersuchungen im *Xenopus*-Oozyten-System (Glaudemans *et al.*, 2012). Hier wird nach Einschleusung einer definierten Menge NCCT-RNA mit artifiziell eingebauter Variante die Aufnahme von radioaktiv markiertem Natrium ($^{22}\text{Na}^+$) gemessen. Zusätzlich wird ebenfalls im *Xenopus* Oozyten-System oder in mammalischen Zelllinien der Transport der entsprechenden Transmembranproteine an die Zelloberfläche, das sogenannte „Trafficking“ untersucht. Je nach dem Verhalten in den genannten Untersuchungen können die verschiedenen Varianten oder Mutationen in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Nach detaillierten Untersuchungen verschiedener Mutationen im bei der zystischen Fibrose betroffenen Chloridtransportprotein CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) hat sich folgende Klassifikation etabliert: Klasse I-Mutationen sind Stop- oder SpliceSite-Mutationen, die zu vorzeitigem Abbruch der Translation und trunkierten (=verkürzten) Proteinprodukten führen. Diese werden überwiegend intrazellulär abgebaut („decreased protein stability“). Klasse II-Mutationen führen zu einer gestörten Proteinreifung („protein processing“) oder einem gestörten Membrantransport (Trafficking). Klasse 3-Mutationen führen zu einer gestörten Regulation des betreffenden Ionentransporters oder Ionenkanals („Gating“). Klasse 4-Mutationen führen zu einer gestörten Ionenleitfähigkeit oder einem gestörten Ionentransport. Bei Klasse 5-Mutationen wird durch Mutation der RNA-SpliceSites oder Mutation des Promotors weniger intakte RNA und damit weniger funktionelles Protein

gebildet. Bei Klasse 6-Mutationen ist die Halbwertszeit der Proteine an der Zelloberfläche durch vermehrten oder vorzeitigen Abbau verkürzt.

Für den beim GS betroffenen NCCT hat sich zudem eine vereinfachte Einteilung in lediglich zwei Klassen etabliert (De Jong *et al.*, 2002): Die Klasse I umfasst nicht-funktionelle Ionentransporter, die nicht glykosyliert werden und nicht die Zelloberfläche erreichen. Die Mutationsklasse II umfasst normal-glykosylierte NCCT-Kotransporter, die jedoch einen verminderten Transport an die Zelloberfläche aufweisen. Nach Erreichen der Zellmembran weisen Klasse II-Mutationen dann aber eine normale Ionentransportfunktion auf.

Die Mehrzahl der untersuchten NCCT-Mutationen konnten der Klasse II dieser vereinfachten Nomenklatur zugeordnet werden (Knoers e Levtschenko, 2008).

Obwohl das GS klassisch autosomal-rezessiv vererbt wird, konnte mit üblichen molekulargenetischen Techniken in den meisten Studien bei einer signifikanten Anzahl Patienten lediglich eine heterozygot vorliegende Mutation detektiert werden (Riveira-Munoz, Chang, Bindels, *et al.*, 2007). Mögliche Erklärungen für diese Tatsache sind beispielsweise Mutationen außerhalb der kodierenden Region oder heterozygote Deletionen, die im Routinescreening nicht detektierbar sind.

Daher wurden zusätzliche Techniken und Screeningmethoden etabliert, um diese fehlenden mutierten Allele zu detektieren. Eine dieser Methoden ist die sogenannte MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) zur quantitativen Darstellung mehrerer DNA-Abschnitte in nur einem Ansatz (Schouten *et al.*, 2002). Es lassen sich mit ihr Dosisunterschiede an einem definierten Ort im Genom nachweisen und so heterozygot vorliegende Deletionen detektieren.

Aufgrund der oben genannten phänotypischen Überlappung zwischen dem Gitelman-Syndrom und dem klassischen Bartter-Syndrom wurde das genetische Screening von Patienten mit Gitelman-Phänotyp zudem um eine Mutationsanalyse des *CLCNKB*-Gens erweitert (Vargas-Poussou *et al.*, 2011). Die Autoren dieser Arbeit konnten bei immerhin 3% ihrer Patienten mit GS *CLCNKB*-Mutationen nachweisen.

Schließlich konnten in einer weiteren Arbeit tiefe intronische Mutationen in den Intronen 13 und 21 des *SLC12A3*-Gens bei Patienten identifiziert werden, die zuvor lediglich eine heterozygote *SLC12A3*-Mutation aufgewiesen hatten bzw. negativ für *SLC12A3*-Mutationen getestet waren (Lo *et al.*, 2011).

1.7.2 Klinische Symptomatik des Gitelman-Syndroms

Patienten mit Gitelman-Syndrom fallen typischerweise im Schulalter oder in der Pubertät mit Krämpfen, Tetanien, zunehmender Ermüdbarkeit, Muskelschmerzen, Obstipation oder Carpopedalspasmen auf. Gelegentlich bestehen auch Gelenkbeschwerden bedingt durch eine Chondrokalzinose (Gitelman *et al.*, 1966; Rudin *et al.*, 1984). Eine signifikante Anzahl von Patienten mit GS bleibt aber auch größtenteils asymptomatisch oder weist lediglich einen subklinischen Verlauf auf. Die charakteristischen Laborbefunde fallen dann manchmal zufällig im Rahmen einer Routineuntersuchung auf. Allerdings konnte in einer Studie gezeigt werden, dass das GS einen ähnlich ausgeprägten Effekt auf die Lebensqualität hat, wie bei Patienten, die an Diabetes oder koronarer Herzkrankheit mit einem vergleichbaren Schweregrad leiden (Cruz *et al.*, 2001). Keiner der untersuchten Patienten war wirklich asymptomatisch. Als häufigste Symptome traten Salzhunger, Nykturie und Parästhesien auf. In Einzelfällen wurden sogar außergewöhnlich schwere Manifestationen mit Rhabdomyolyse und Paralyse beschrieben (Cruz *et al.*, 2001). Die Erkrankung resultiert bei einigen Patienten in einem Minderwuchs (Seyberth *et al.*, 1998).

Interessanterweise weisen nicht nur Patienten mit unterschiedlichen Mutation(en), sondern auch Träger derselben *SLC12A3*-Mutation(en) die beschriebene phänotypische Variabilität auf (Jeck *et al.*, 2000). Die Gründe, die zu dieser unterschiedlichen Krankheitsausprägung führen, sind noch wenig verstanden. Als mögliche Erklärung werden Art und Position der vorliegenden Mutationen oder möglicherweise modifizierend-wirkende andere Gene vermutet.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wird beschrieben, dass 44% (n=16) der untersuchten Kohorte erwachsener GS-Patienten erstaunlicherweise einen Bluthochdruck entwickelten (Berry *et al.*, 2013). Die Autoren vermuteten, dass dieses Phänomen durch den chronischen sekundären Hyperaldosteronismus begründet sein könnte (Berry *et al.*, 2013).

Als Behandlungsmöglichkeiten für das GS stehen verschiedene therapeutische Ansätze zur Verfügung. Hierzu zählen einerseits die Substitution von Magnesium und/oder Kalium (Nakhoul *et al.*, 2012b) als auch die bei den verschiedenen Formen des Bartter-Syndroms angewandten nichtsteroidalen Antirheumatika wie z.B. Indometacin. Darüber hinaus finden auch Medikamente Anwendung, die die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems (ACE-Hemmer oder auch Spironolacton) hemmen, oder das Diuretikum Amilorid, das den Aldosteron-gesteuerten apikal gelegenen Natriumkanal ENaC im distalen Tubulus blockiert. Die Anwendung der letztgenannten Medikamente wird meist jedoch durch die negative Wirkung auf den Blutdruck limitiert.

Die Hypomagnesiämie stellt ebenfalls eine therapeutische Herausforderung dar, da sie mit einer oralen Magnesiumsubstitution teilweise nur unzureichend beeinflusst werden kann. Eine Korrektur der Hypomagnesiämie hat jedoch gerade zur Beseitigung von zentralen Symptomen wie Tetanien, Carpopedalspasmen und auch Gelenkbeschwerden einen entscheidenden Einfluss. Leider ist der Ausgleich des Magnesiumdefizits durch die intestinalen Nebenwirkungen der oralen Magnesiumsubstitution limitiert.

Da es Berichte über Patienten mit GS gibt, die am plötzlichen Herztod verstarben, wird empfohlen auch regelmäßige kardiologische Kontrollen mit Echokardiographie und Elektrokardiogramm zur Diagnostik der QT-Zeit durchzuführen, um Risikofaktoren für kardiale Arrhythmien auszuschließen. Des Weiteren sollten Medikamente, die das QT-Intervall verlängern, vermieden werden.

Tabelle 3: verantwortliche Gene, resultierende Transportproteine , deren Lokalisation und Funktion des aBS, cBS, BSND und GS

	Gen	Gen-Locus	Funktion	Lokalisation	Genprodukt
aBS	<i>SLC12A1</i>	15q15-21	NaCl-Reabsorption	TAL	$\text{Na}^+ \text{-Cl}^- \text{-2Cl}^-$ - Cotransporter NKCC2
cBS	<i>CLCNKB</i>	1p36	Cl-Reabsorption	TAL und DCT	Cl-Kanal ClC-Kb
BSND	<i>BSND</i>	1p31	β -Untereinheit von ClC-Kb β -Untereinheit von ClC-Ka	TAL und DCT Stria vascularis	Barttin
GS	<i>SLC12A3</i>	16q13	NaCl-Reabsorption	DCT	$\text{Na}^+ \text{-Cl}^-$ - Cotransporter NCCT

TAL = thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule

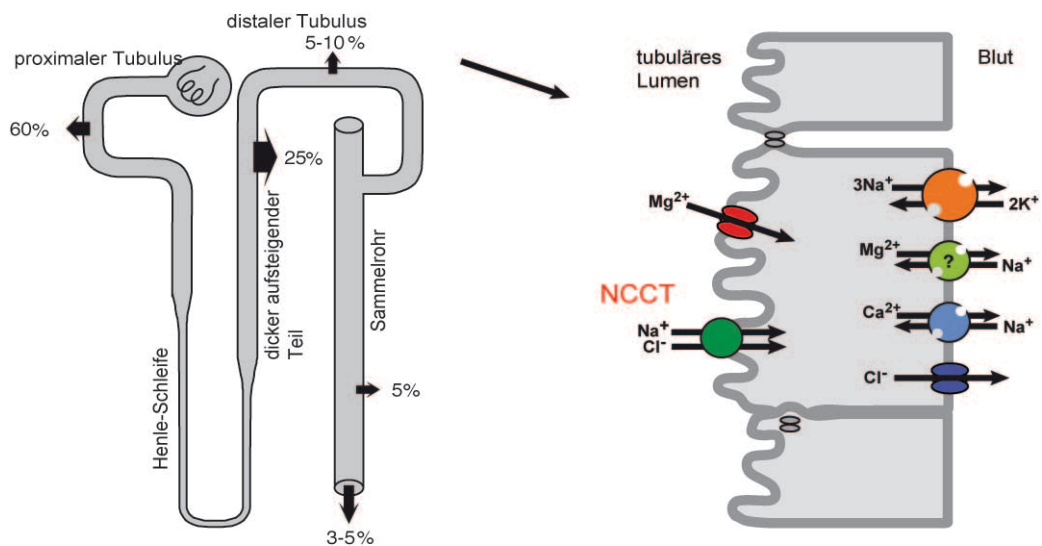


Abbildung 1: Salzresorption entlang des Nephrons und im distalen Konvolut (DCT), Prozentsätze des gefilterten Kochsalzes welches im jeweiligen Nephronsegment reabsorbiert wird (linke Seite). Salzreabsorption im distalen Konvolut (DCT) (rechte Seite), Natrium und Chlorid werden in die DCT-Zelle über den NCCT-Cotransporter aufgenommen.

1.8 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Seit der Erstbeschreibung durch Simon und Mitarbeiter konnte eine Reihe von Mutationen wiederholt in voneinander unabhängigen Kohorten von Patienten gefunden werden. Diese Patienten stammten aus Zentraleuropa und wiesen folgende Mutationen auf: G741R, G439S, C994Y, IVS24(+1)G>T und L859P auf (Lemmink *et al.*, 1996; Mastroianni *et al.*, 1996; Simon e Lifton, 1996; Lemmink *et al.*, 1998; Syrén *et al.*, 2002; Urbanová *et al.*, 2006; Fava *et al.*, 2007; Riveira-Munoz, Chang, Godefroid, *et al.*, 2007).

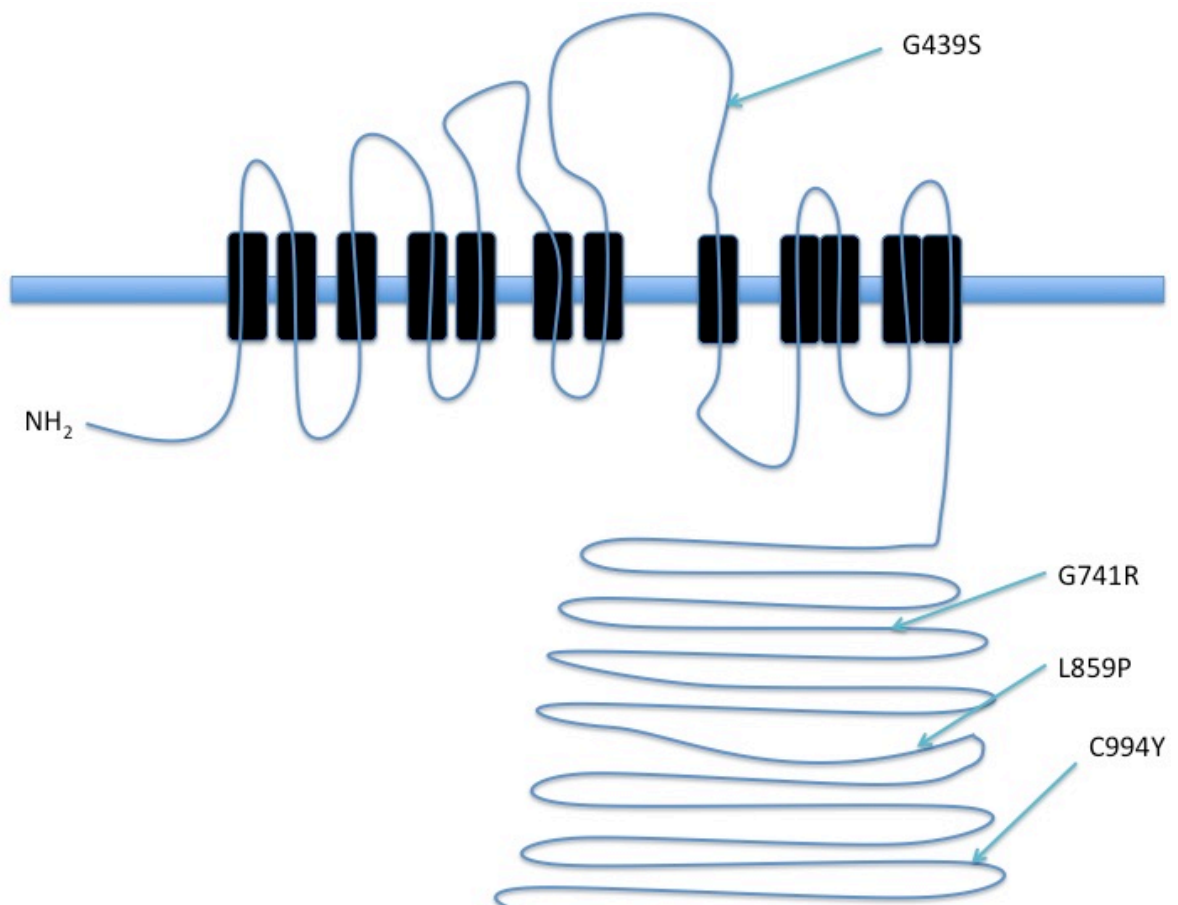


Abbildung 2: Struktur des SLC12A3-Gens. Die Pfeile weisen auf die Lokalisation der vier untersuchten Missense-Mutationen.

Eine Publikation aus den Niederlanden identifizierte als erste die G741R-Mutation in drei miteinander nicht verwandten Familien und vermutete bereits einen gemeinsamen holländischen Vorfahren (Lemmink *et al.*, 1996). Seitdem konnte die Mutation G741R immer wieder in voneinander unabhängigen Populationen entdeckt werden (Lemmink *et al.*, 1998; Urbanová *et al.*, 2006; Riveira-Munoz, Chang, Godefroid, *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2008). Eine weitere Veröffentlichung von Urbanová und Kollegen identifizierte diese Mutation, sowie

auch die Mutation G439S bei ihren Patienten, die aus der Tschechischen Republik und der Slowakischen Republik stammen. Diese Tatsache deutet auf ein weiter verbreitetes Vorkommen dieser Mutationen in Zentraleuropa hin (Urbanová *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu kommt die Mutation G741R offenbar nicht häufig in Italien vor (Mastroianni *et al.*, 1996; Syrén *et al.*, 2002). Die vorherrschende Rolle der oben genannten Mutationen wurde in einer der größten GS-Kohorte durch Lifton und Mitarbeiter untermauert. In dieser Gruppe konnten alle fünf genannten Mutationen bei einem signifikanten Prozentsatz von Patienten nachgewiesen werden (Anzahl der Patientin insgesamt = 246, Frequenzen für G741R = 13%, G439S = 4%, C994Y = 1%, IVS 24 = 11%, L859P = 4% aller identifizierten mutierten Allele) (Ji *et al.*, 2008).

Im Rahmen von in den letzten Jahren in Marburg durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen konnte eine große Kohorte von insgesamt über 100 Patienten mit Gitelman-Syndrom genotypisch charakterisiert werden. Das Screening des *SLC12A3*-Gens erfolgte mittels SSCP-Analyse. Bei dieser werden kurze Genabschnitte mittels PCR amplifiziert und dann in Abhängigkeit von der Basensequenz in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abbildung 9 und Abbildung 10). Mutationen führen hierbei zu einem veränderten Laufverhalten in der Gelelektrophorese. Auffällige Proben wurden anschließend direkt mittels konventioneller Sanger-Technik sequenziert.

Der Terminus Haplotypisierung bezeichnet die Analyse der allelischen Zusammensetzung der beiden homologen Chromosomen. Mütterliche und väterliche Allele können unter Zuhilfenahme der Haplotypen differenziert werden. Aufgrund häufig stattfindender Crossing-Over-Ereignisse werden allerdings nicht ganze Chromosomen konstant vererbt. Vielmehr steigt die Wahrscheinlichkeit von Rekombinationsereignissen mit zunehmender physikalischer Entfernung zweier Genloci. Der die krankheitsrelevante Mutation tragende Chromosomenabschnitt wird somit bei abnehmendem Verwandtschaftsgrad immer kleiner. Patienten, die miteinander entfernt verwandt sind, besitzen daher oft nur noch auf einem kleinen, die unmittelbare Umgebung des krankheitsrelevanten Gens umfassenden Abschnitt identische

Haplotypen. Bei der Haplotypenanalyse von Patienten mit GS wurden daher sogenannte Mikrosatelliten untersucht, die in der unmittelbaren Umgebung des *SLC12A3*-Gens liegen, um eine gemeinsame Abstammung der Patienten nachzuweisen.

Unter Mikrosatelliten versteht man repetitive Sequenzen, sogenannte „short tandem repeats“ (mehrfache Aneinanderreihungen beispielsweise der Basen AG- oder GT), die in ihrer Länge stark variieren können. Die Mikrosatelliten-Analyse bietet dabei gegenüber der weiter unten beschriebenen Analyse von Einzelbasen-Polymorphismen (SNPs – single nucleotide polymorphism) den Vorteil einer großen Allelzahl. Dadurch können insbesondere bei Vorliegen von Erbmaterial beider Eltern oder im Fall mehrerer betroffener Geschwister die bei einem Patienten identifizierten Mutationen eindeutig einem bestimmten Allel zugeordnet werden. Die Untersuchung von Mikrosatelliten erlaubt theoretisch durch Bestimmung der Größe des gemeinsam vererbten Genomabschnitts auch eine Abschätzung des Alters einer sogenannten Founder-Mutation.

Mit dieser Methode konnte beispielsweise der Nachweis eines gemeinsamen Vorfahren bei Patienten mit familiärer Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) erbracht werden (Abbildung 3) (Weber *et al.*, 2001). Patienten mit der bei dieser Erkrankung häufigsten Mutation L151F weisen dabei in der Umgebung des mutierten *CLDN16*-Gens einen gemeinsamen mutations-assoziierten Haplotypen auf.

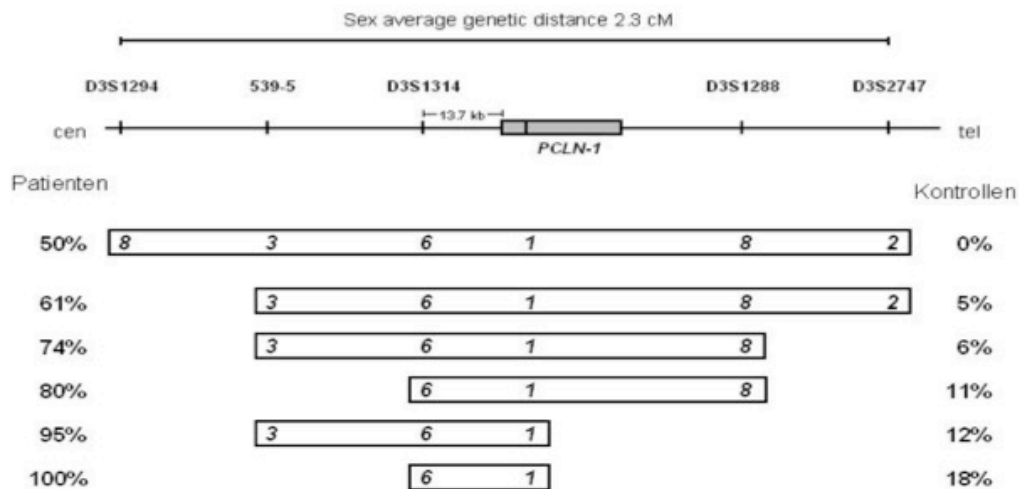


Abbildung 3: Nachweis eines Foundereffekts am Beispiel des *CLDN16*-Gens bei Patienten mit *PCLN-1* Mutation L151P (Weber *et al.*, 2001). Darstellung der Prävalenzen des Mutations-assoziierten Haplotyps bei Patienten mit L151P-Mutation im Vergleich zu gesunden Kontroll-Personen. Während alle Patienten einen gemeinsamen Haplotypen für die unmittelbare Umgebung des *PCLN-1* Gens aufweisen, nimmt die Prävalenz des Mutations-assoziierten Haplotyps mit zunehmender Entfernung der Mikrosatelliten Marker ab. Dennoch weisen noch 50% der Patienten über eine genomische Distanz von 2.3cM einen gemeinsamen Haplotypen auf (im Vergleich zur Prävalenz von 0% für diesen Haplotypen bei Kontrollpersonen). Die Ziffern 8-3-6-1-8-2 bezeichnen die jeweiligen Allele bei großer Polymorphizität der einzelnen Marker.

Darüber hinaus ist eine Haplotypenanalyse im Bereich eines krankheitsverursachenden Gens auch durch Analyse sogenannter „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) möglich. Unter dem Begriff SNP versteht man Einzelnukleotid-Polymorphismen im Sinne von Variationen und Abweichungen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang von der genomischen Referenzsequenz. Im Gegensatz zu den meistens in größerer Entfernung lokalisierten Mikrosatelliten ist wegen der Häufigkeit von SNPs eine detaillierte Bestimmung der Haplotypen auch innerhalb eines Gens möglich. Darüber hinaus hat die Haplotypenanalyse mit SNPs gezeigt, dass bestimmte kürzere Chromosomenabschnitte, sogenannte Haplotypen-Blocks, sehr konstant vererbt werden. Innerhalb dieser Haplotypen-Blocks lassen sich sogenannte „Haplotype Tagging SNPs“ (htSNPs) definieren, deren Allel stellvertretend den gesamten Block repräsentiert. Hinweise auf eine mögliche entfernte Verwandtschaft der Patienten mit einer der fünf genannten Mutationen, lassen sich bei Kenntnis dieser Haplotypen-Blocks dann möglicherweise durch die Auswertung von im Mutationsscreening erfassten Polymorphismen gewinnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Kohorte von Patienten mit GS ((n=73), betroffene Geschwister nur einfach gezählt), überwiegend kaukasischer Abstammung, untersucht. Mit Hilfe einer detaillierten Haplotypenanalyse bei den GS-Patienten mit den fünf häufigsten bei Kaukasiern detektierten Mutationen soll die Frage nach der Entstehung der beobachteten Mutationshäufung geklärt werden. Die Haplotypenanalyse erfolgt mit Hilfe der zwei oben genannten Analysen von Mikrosatellitenmarkern und SNPs.

Ziel ist die Identifizierung eines gemeinsamen, mutationsassoziierten Haplotyps bei Patienten mit jeweils einer der fünf genannten Mutationen. Auf Basis der Allelfrequenzen der untersuchten Mikrosatelliten-Marker, die sich innerhalb des Kopplungsungleichgewichts (linkage disequilibrium) befinden, sowie des Abstands der Marker vom *SLC12A3*-Gen wäre dann im Anschluss eine Berechnung des Alters einer durch einen Founder-Effekt entstandenen Mutation möglich (Colombo, 2000).

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Für die Durchführung dieses Projekts wurde ein Patientenkollektiv von 73 Patienten untersucht, bei denen die Diagnose eines GS bereits genetisch gesichert worden war.

Die Mutationsanalyse des *SLC12A3*-Gens bei den genannten 73 Patienten konnte 116 der erwarteten 146 mutierten Allele detektieren. Es stellte sich dabei heraus, dass 61 mutierte Allele (53%) in 49 nicht miteinander verwandten Patienten (67%) eine der fünf häufigsten Mutationen aufwiesen (22-mal G741R, 14-mal G439S, 13-mal C994Y, 7-mal IVS24(+1)G>T, 5-mal L859P Allele) (Tabelle 4: Patientenkollektiv mit entsprechenden Mutationen). 11 Patienten (15%) waren sogar Träger von zwei der fünf genannten Allele entweder in compound-heterozygotem oder homozygotem Zustand. Zusätzlich zu den fünf hier näher untersuchten Mutationen konnten 43 weitere Mutationen identifiziert werden.

Tabelle 4: Patientenkollektiv mit entsprechenden Mutationen

Nummer	Patienten-Code	Allel 1	Allel 2
1	7013	P656Q	?
2	7039	R642H	C994Y
3	7160	R261H	?
4	7179	954delE	?
5	7208	Q644fs	T1026I
6	7337	A356V	A356V
7	7339	L738R	G741R
8	7342	M1V	?
9	7363	I253fs	?
10	7417	G439S	G741R
11	7423	G741R	?
12	7427	L859P	?
13	7441	G439S	G439S
14	7460	G439S	?
15	7471	L859P	?

16	7531	A224D	?
17	7603	S178L	G729V
18	7646	S126fs	A356V
19	7680	G202V	G439S
20	7685	IVS5(+1)G>A	R158P
21	7691	L859P	IVS24(+1)G>A
22	7698	G439S	?
23	7746	G439S	C994Y
24	7749	R399C	R399C
25	7773	C994Y	?
26	7796	IVS24(+1)G>T	?
27	7806	L542P	G741R
28	7818	L215P	G741R
29	7841	R209Q	G729V
30	7848	P687fs	G741R
31	7861	G741R	?
32	7871	L272P	?
33	7882	C994Y	?
34	7933	IVS24(+1)G>T	G741R
35	7936	G463R	?
36	7974	IVS24(+1)G>T	G741R
37	7993	S614P	S614P
38	7994	G741R	C994Y
39	7996	IVS5(+1)G>T	G741R
40	10010	G741R	?
41	10012	G731R	R896Q
42	10039	G741R	?
43	10053	G439S	R642C
44	10054	G741R	G741R
45	10079	R655C	IVS24(+1)G>T
46	10119	G439S	IVS5(+1)G>A
47	10158	G439S	G741R
48	10166	L859P	?
49	10202	G729V	G741R
50	10212	T382M	G741R
51	10217	N526S	G741R
52	10226	G439S	?
53	10228	G741R	L891fs
54	10234	R158Q	G439S

55	10247	L542P	C994Y
56	10270	L859P	R896Q
57	10271	IVS14(+1)G>C	IVS24(+1)G>T
58	10276	G439S	G741R
59	10289	S833T	?
60	10313	IVS24(+1)G>T	G741R
61	10337	R209Q	S402fs
62	10352	L905F	C994Y
63	10374	C994Y	?
64	10376	C994Y	?
65	10389	W948*	?
66	10394	R321W	?
67	10405	A13P	?
68	10406	I580fs	C994Y
69	10426	G876S	?
70	10436	C994Y	?
71	10453	G439S	?
72	10457	S178L	S178L
73	10460	C994Y	C994Y

Jede der fünf genannten häufigen Mutationen konnten bereits zuvor bei Patienten mit GS nachgewiesen werden (Riveira-Munoz, Chang, Godefroid, *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2008). Die Mutation IVS24(+1)G>T betrifft die konservierte Donor-Splice-Site von Exon 24. Durch sie wird das korrekte Splicing der *SLC12A3*-RNA verhindert. Bezüglich der vier Missense-Mutationen liegen Funktionsanalysen für G741R, G439S und C994Y vor. De Jong und Kollegen teilten NCCT-Mutanten, wie bereits in Abschnitt 1.7.1 beschrieben, in zwei verschiedene Klassen ein (De Jong *et al.*, 2002). G741R und G439S repräsentieren Klasse I-Mutanten ohne signifikante Natrium-Aufnahme, wohingegen die Klasse II-Mutante C994Y eine signifikante Natrium-Aufnahme im *Xenopus laevis*-System aufweist (De Jong *et al.*, 2002). Die Mutation L859P ist bislang nicht funktionell untersucht worden.

Ein aus 51 Personen bestehendes Kollektiv gesunder deutscher Probanden (≈ 102 Chromosomen) diente als Kontrollgruppe zur Ermittlung der Allelfrequenzen der Mikrosatelliten-Marker in der Normalbevölkerung. Die

Allelfrequenzen der im zweiten Analyseschritt untersuchten SNPs der GS-Patienten wurden mit öffentlich verfügbaren SNP-Daten des HapMap-Projektes verglichen (www.hapmap.org). Auch hier wurden ausschließlich mitteleuropäische (kaukasische) Kontrollpersonen verwendet (n=60, CEPH-Kohorte, Centre d'Etude du Polymorphisme Humain).

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte und Hilfsmittel

Nachfolgend werden die allgemeinen Geräte und Hilfsmittel aufgelistet, auf die im folgenden Text nicht erneut gesondert verwiesen wird:

- Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Fa. Heraeus, Osterode)
- Vakuumzentrifuge DNA plus (Fa. Heto, Allerød, Dänemark)
- Tischzentrifuge/ Vortex Combi-Spin FVL – 2400 (Fa. Peqlab, Erlangen)
- Power Supply – EPS 600 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Feinwaage Adventurer (Fa. Ohaus, Pinebrook, NJ/USA)
- Milli-Q-Water System ELIX 100 (Fa. Millipore, Eschborn)
- Laborrührer MR 3001K (Fa. Heidolph, Kelheim)
- Überkopfdreher REAX2 (Fa. Heidolph, Kelheim)
- Plattformschwenker Rocky® (Fa. Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau)
- pH-Meter Cyberscan 510 (Fa. Eutech Instruments, Shanghai/China)
- Mikrowellenofen Intellrowave (Fa. LG, Korea)
- Dampfsterilisator Systec 3870 ELV (Fa. Biomedis, Gießen)
- Photodokumentationssystem Infinity Caputre V.14.2
(Fa. Vilber Lourmat, Marne/Frankreich)
- UV-Flächenstrahler Infinity 3000.WL
(Fa. Vilber Lourmat, Marne/Frankreich)
- Finnpiquette® 0,5-10µl, 2-20µl, 10-100µl, 100-1000µl
(Fa. Thermo Electron, Oberhausen)
- Pipettenspitzen (Fa. Starlab, Ahrensburg)

- Pasteurpipetten (Fa. Brand, Wertheim)
- Eppendorf-Cups (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- PCR-Tubes (Fa. Biozym Diagnostik, Oldendorf)
- Spritzen (Fa. Becton Dickinson, Dublin/Irland)
- Präzisionswischtücher (Fa. Kimberly-Clark, Mississauga/ Canada)

2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Die nachfolgend aufgelisteten Chemikalien entsprachen alle dem Reinheitsgrad p.a.

- Borsäure Art.# 1.00165 (Fa. Merck, Darmstadt)
- Bromphenolblau Na-Salz Art.# A512.1 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- DEPC Art.# 216-542-8 (Fa. Sigma, Steinheim)
- Essigsäure 100% Art.# 222140025 (Fa. Acros Organics, NJ/USA)
- Ethidiumbromid 1% Art.# 2218.1 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Na-EDTA Art.# 074K0004 (Fa. Fluka Biochemika, Neu-Ulm)
- Tris Art.# 14050010 (Fa. Acros Organics, NJ/USA)
- Xylencyanol Art.# A513.1 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- 100 base-pair ladder Art.# 15628-050 (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- DEPC-H₂O
- 1M Tris-HCl, pH 8,0
- 0,5M EDTA, pH 8,0
- TE-Puffer, pH 8,0
- TAE-Puffer, pH 8,0
- TBE-Puffer
- loading buffer

2.3 Methoden

2.3.1 Gelelektrophoresen

2.3.1.1 Beschreibung

Für das hier beschriebene Projekt wurden die DNA-Fragmente mittels Agarose- oder Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. Polyacrylamid und Agarose verfügen über ein starkes Adsorptionsvermögen für gelöste Stoffe, Gase und Dämpfe. Diese Wirkung wird als „Molekularsiebeffekt“ beschrieben. Der Molekularsiebeffekt basiert darauf, dass die Molekularsiebe einheitliche Porendurchmesser aufweisen, die sich in der Größenordnung des Durchmessers von Molekülen befinden. Dadurch lassen sich auch Nukleinsäure-Moleküle besonders gut nach ihrer Größe trennen. Kleine Moleküle haben also längere und große Moleküle kürzere Laufwege in dem jeweiligen Gel.

Relativ große Poren weisen Agarosegele (150 nm bei 1%igen Gelen, 500 nm bei 0,16%igen Gelen) auf. Polyacrylamidgele sind hingegen wesentlich feinporiger (3-6 nm), wobei die Porengröße jedoch von der Acrylamidkonzentration und dem Vernetzungsgrad abhängt.

Da die für die hier vorgestellte Arbeit relevanten DNA-Fragmente eine Länge von 100 bis 300 bp zeigen, wurden 1,25%ige (w/v) Agarosegele gegossen. Mit dieser Konzentration ist die Voraussetzung für möglichst kleine Poren gegeben.

Die durchgeführte Elektrophorese entspricht dem Prinzip der Zonenelektrophorese, bei der die Trennung von amphoteren und nicht-amphoteren Stoffen in einem homogenen Puffersystem mit konstantem pH-Wert durch ein elektrisches Feld abläuft. Der Gelschlitten wird dabei in eine mit TBE-Puffer (pH=8,0) gefüllte Gelelektrophoresekommer gelegt. Der Puffer bedeckt das Gel dabei vollständig. Abweichend zu dieser Methodik wird bei der Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli *et al.*, 1970) das Gel zwischen zwei Glasplatten gegossen, unter UV-Licht gehärtet und lediglich die freien Enden in

eine 0,6%ige TBE-Pufferlösung (120ml 10xTBE ad 2L MQ-H₂O) eingetaucht. Hauptladungsträger der Nukleinsäuren sind die Phosphatgruppen. Dabei haben alle Nukleotidbausteine die gleichen pK-Werte. Diese Tatsache ist zum einen dafür verantwortlich, dass die Auftrennung der Fragmente nicht von einem Ladungsungleichgewicht abhängt und außerdem darauf zu achten ist, dass keine pH-Wertunterschiede gegeben sind. Zu diesem Zweck wird die genannte TBE-Pufferlösung verwendet. Zum Laufverhalten der Nukleotide ist zu erwähnen, dass die Trennung nach der elektrophoretischen Mobilität erfolgt. Als Maß für diese Mobilität dient die zurückgelegte Strecke im Trennmedium innerhalb eines definierten Zeitraumes. Die Gelkonzentration, Pufferkonditionen und Stromstärke haben somit wesentlichen Einfluss auf die Mobilität der Analyten.

2.3.1.2 Material

Agarosegel: - Gelelektrophorese-Schlitten (Fa. MWG, Ebersberg)

Polyacrylamidgel: - Elektrophorese-Set bestehend aus:
Heizplatte (short), Glasplatte (short), Spacer (0,3mm),
Kamm (0,3mm)
- UV-Lampe

Agarosegel: - Seakem LE Agarose, Art.# 5004AG5073
(Fa. Cambrex, ME/USA)
- 1x TBE-Puffer
- GLP-Lösung
- 100 bp-ladder-Lösung (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- Ethidiumbromid 1%

Polyacrylamidgel: - Reprogel®-Kit Art.# 17-6001-08
(Fa. GE healthcare, München)
beinhaltet:
Solution A (Plus One™ Silver Staining kit) 24% Acryamid
Solution B

2.3.1.3 Durchführung

Zunächst wird ein wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschriebenes 1,25%iges Agarosegel gegossen. Dazu werden 1,25g Agarose auf 100ml MQ-H₂O in einen Erlenmeyer-Kolben gegeben, in der Mikrowelle erhitzt, bis sich alle Agarose-Kristalle gelöst haben. Bevor das noch dickflüssige Gel in einen Gelschlitten zum Aushärten geschüttet wird, werden noch 1,2µl Ethidiumbromid hinzugesetzt.

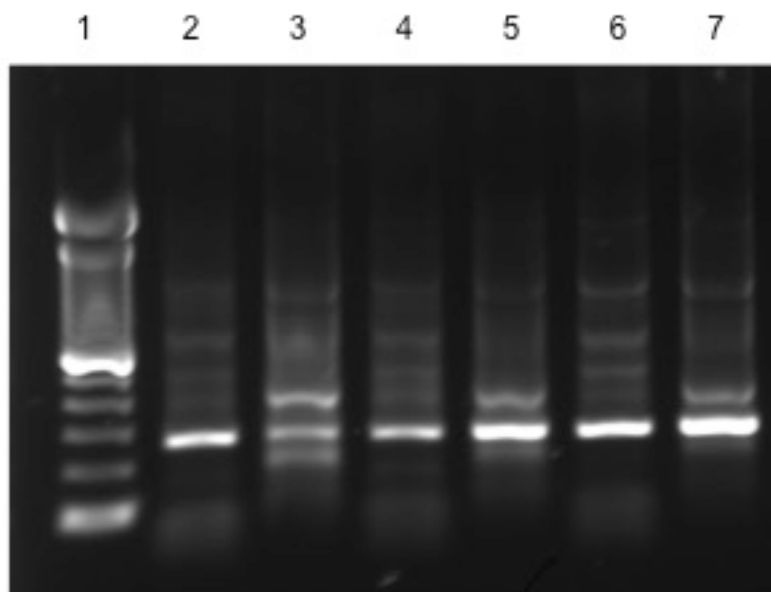


Abbildung 4: PCR-Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung. Laufspur 1 = DNA-Leiter, Laufspuren 2-7 = Patienten-DNA

Um die gewünschten Geltaschen zu erhalten, werden in den das dickflüssige Gel enthaltenden Schlitten noch Kämme gesteckt. Nach etwa 30-45 Minuten ist das Gel ausgehärtet, was sich an einer milchigen Trübung erkennen lässt. Die Kämme werden nun vorsichtig aus dem gehärteten Agarosegel entfernt und dieses in die mit TBE-Puffer befüllten Kammern gelegt, so dass es vollständig bedeckt ist. In die jeweils erste und letzte Tasche des Gels wird nun der mitgeführte Standard (100 bp-Ladder-Lösung) pipettiert. Er dient der Ermittlung der Fragmentlänge. Die weiteren Taschen werden mit jeweils mindestens 5µl des PCR-Produkts und 5µl Gelladepuffer-Lösung beschickt. Um die Trennung der Fragmente zu starten, wird an „Start-“ und „Stoppseite“ nun eine Spannung mit Gleichstrom über Elektroden angelegt (ca.130V und 100mA). Dies hat zur Folge, dass die negativ geladenen Moleküle in Richtung der Anode wandern.

Der farbstoffhaltige Puffer (Gelladepuffer-Lösung) gibt dabei einen groben Hinweis auf die bisher zurückgelegte Laufstrecke. Nach Beendigung der Laufzeit wird die Stromquelle abgestellt und der Gelschlitten mit dem Agarosegel herausgenommen. Um nun die Banden sichtbar zu machen, wird das Gel vorsichtig auf die Fotoplatte des Flächenstrahlers gelegt. Die DNA-Banden fluoreszieren intensiv orange, weil sich das zugefügte Ethidiumbromid zwischen den Basenpaaren interkaliert hat. Nun erfolgt die Dokumentation des Ergebnisses.

2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.3.2.1 Beschreibung

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine molekulargenetische Methodik zur *in vitro* Amplifikation von DNA mit der Möglichkeit großer Selektivität. Der Ausdruck „Kettenreaktion“ erklärt sich mit der Tatsache, dass die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus dienen und somit eine exponentielle Vervielfältigung ermöglichen. Die Arbeitsweise stellt eine enzymatische Vervielfältigung eines vorliegenden DNA-Fragments dar, der so millionenfach konzentriert wird, um damit in ausreichender Menge für Analysen z.B. den Nachweis von Mutationen zur Verfügung zu stehen (White *et al.*, 1989).

Um die PCR als diagnostisches Hilfsmittel adäquat nutzen zu können, müssen die Nukleotidsequenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts bekannt sein, da im Rahmen der zyklischen Reaktion immer wieder Oligonukleotid-Primer an Bereiche außerhalb des benötigten Bereichs binden. Um exakt das gewünschte DNA-Fragment zu erhalten, werden jeweils ein Vorwärts-Primer und ein Rückwärts-Primer eingesetzt, die jeweils gegenläufig an komplementäre Stränge binden und damit den erwünschten Abschnitt begrenzen. Der eigentliche Ablauf der PCR ist ein Prozess, der aus sich wiederholenden Zyklen der Denaturierung, Hybridisierung der Primer und DNA-Synthese besteht. Da für die Denaturierung sehr hohe Temperaturen benötigt werden, ist die Verwendung von thermostabilen Polymerasen notwendig, die eine Aufeinanderfolge mehrerer Reaktionszyklen erlauben. Meistens kommt bei der

PCR die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammende Taq-Polymerase zum Einsatz. Als das Verfahren der PCR noch nicht vollständig ausgereift war, mussten dem Reaktionsansatz nach jedem Amplifikationsschritt neue Enzymproben hinzugesetzt werden (Mullis e Faloona, 1987).

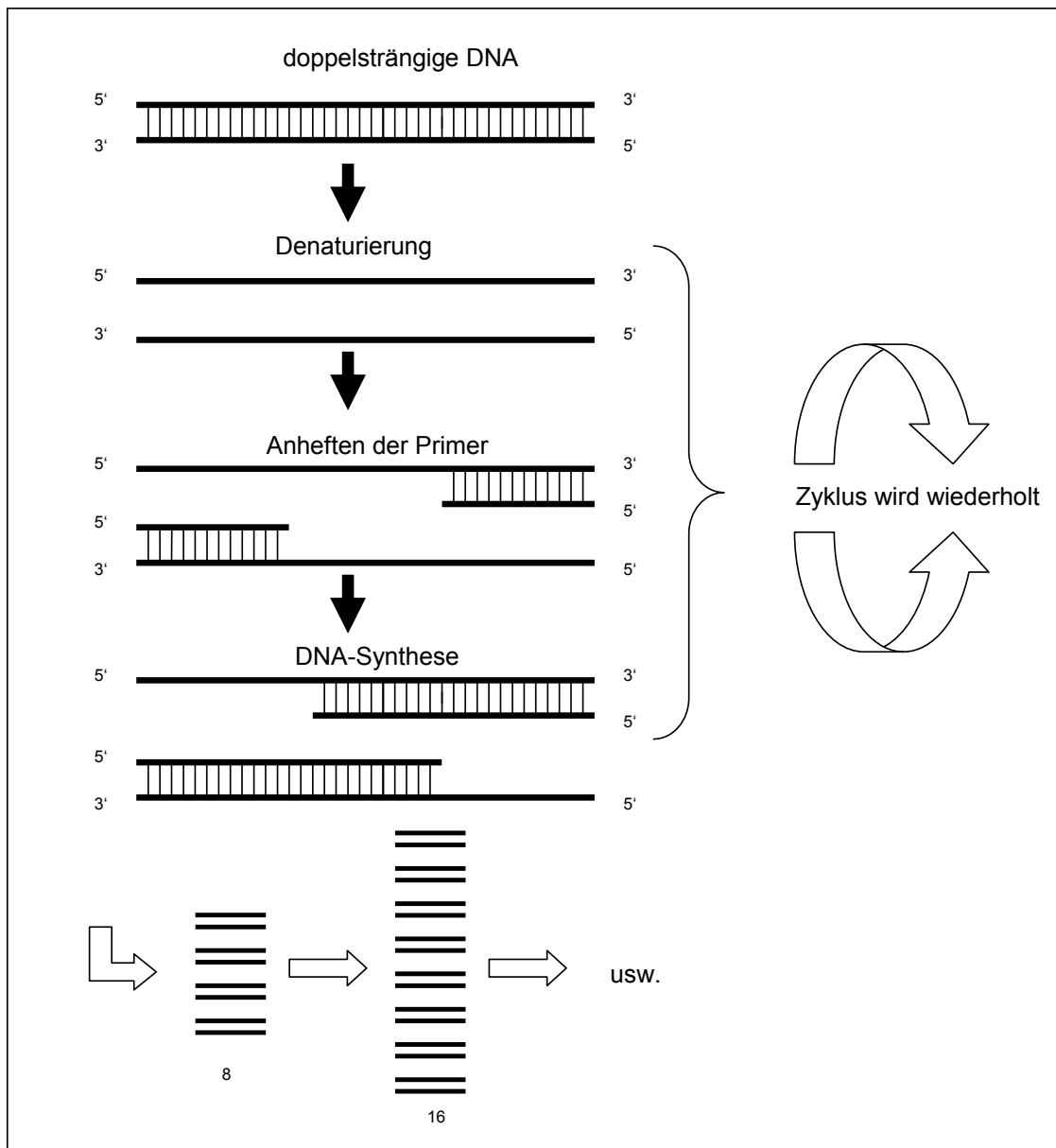


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.3.2.2 Amplification-refractory-mutation-system-PCR (ARMS-PCR)

Bei diesem Projekt setzten wir im Rahmen der SNP-Analysen eine Sonderform der PCR ein - die ARMS-PCR-Methodik. Diese beruht auf einer allel-spezifischen Amplifikation durch beabsichtigte Paarung bzw. Fehlpaarung des

letzten Nukleotides am 3'-Ende eines PCR-Primers unter stringenten, d.h. sehr genau optimierten, PCR-Bedingungen (Newton *et al.*, 1989). Es werden zwei zuvor synthetisierte Primer eingesetzt, die sich nur im letzten 3'-Nukleotid unterscheiden. Durch diese Base sind die Primer spezifisch für Allel 1 oder Allel 2 der DNA-Sequenz, in welcher der jeweilige SNP liegt. Um festzustellen, welches der beiden Allele bei einem Patienten vorhanden ist, werden zwei getrennte PCR-Reaktionen durchgeführt. Jeweils einer der allelspezifischen Vorwärts-Primer (Forward 1 oder Forward 2) und ein identischer Rückwärts-Primer werden dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Der Ablauf der PCR-Reaktion bzw. die Amplifikation des Genabschnitts kann nur dann erfolgen, wenn das letzte Nukleotid am 3'-Ende des Primers an dieser Stelle der Ziel-DNA komplementär ist. Ist dies nicht der Fall, erfolgt unter stringenten Bindungen keine Elongation des DNA-Stranges in der PCR. Die Synthese eines PCR-Produktes kann also im Fall der Fehlpaarung nicht erfolgen. Die PCR-Produkte werden auf ein Agarosegel aufgetragen, um zu prüfen, ob Produkte entstanden sind, d.h., ob ein Allel vorliegt oder nicht (Abbildung 6).

Die 13 von uns ausgewählten SNPs wurden primär mit der im Folgenden beschriebenen ARMS-PCR Methodik analysiert. Das Ergebnis der SNP-Analyse sollte eine genaue Charakterisierung der Haplotypen im Bereich des *SLC12A3*-Gens in Abhängigkeit der detektierten Mutationen bei der untersuchten Patientengruppe ermöglichen. Um häufige Haplotypen und eine Haplotypen-Block-Struktur mit ausreichender Zuverlässigkeit zu erfassen, ist in der Literatur eine Analysedichte von ~4 SNPs pro 10 kb genomische Sequenz beschrieben (Fullerton *et al.*, 2004). Daraus resultierend ließe sich eine Anzahl von ungefähr 20 SNPs ableiten, deren Analyse im Bereich des ~48 kb umspannenden *SLC12A3*-Gens zur Haplotypen-Darstellung durchgeführt werden müsste.

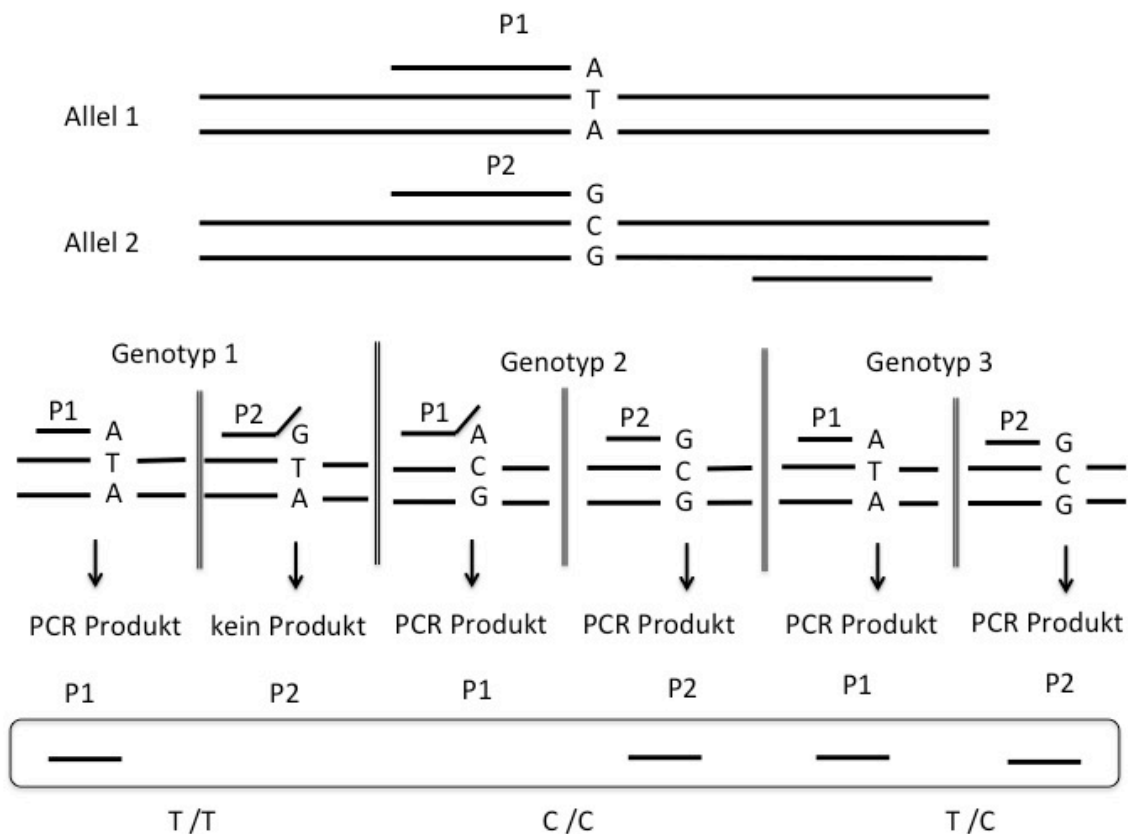


Abbildung 6: schematische Darstellung der ARMS-PCR zur SNP-Analyse

Pro Patient werden also zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen angesetzt und auf dem Gel analysiert. Bei homozygoten Patienten lässt sich jeweils nur eine Bande nachweisen (Forward 1 *oder* Forward 2), bei heterozygoten Patienten werden sowohl bei dem Produkt mit Forward-Primer 1 als auch Forward-Primer 2 Banden sichtbar. Mit dieser Methode ist es so möglich, Einzelbasen-Polymorphismen allelspezifisch zu amplifizieren.

2.3.2.3 Material

- Labcycler (Fa. Sensquest, Göttingen)
- PCR Softtubes 0,2ml Art.# 711080, Biozym Diagnostik, Oldendorf
- Mikro Amp™ Base Art.# N801-0540 (Fa. Applied Biosystems, CA/USA)
- Mikro Amp™ Tray Art.# N801-0541 (Fa. Applied Biosystems, CA/USA)
- Elektrophorese-Einheit Easy Cast Model #B2 (Fa. Owl, NY/USA)

- Taq-Polymerase Art.# 037K6138 (Fa. Sigma, Steinheim)
- 10x PCR-Puffer Art.# P2192-1VL (Fa. Sigma, Steinheim)
- dNTP-Mix 10mM Art.# 20-3011 (Fa. Peqlab, Erlangen)
- Oligonukleotid-Primer (Fa. MWG, Ebersberg)
- DEPC-H₂O

2.3.2.4 Durchführung

Die Sequenzen für die in Abschnitt 2.3.2.1 angesprochenen Primer wurden anhand der öffentlich verfügbaren humanen genomischen DNA-Sequenz (www.ncbi.nlm.nih.gov) designt. Das Design des ersten Primers („Forward 1 und Forward 2“) war aufgrund der letzten Base bereits festgelegt. Das Design des Rückwärts-Primers erfolgte über ein Primer-Design-Programm (primer3, www.primer3.ut.ee). Der Rückwärts-Primer besteht aus einer antegraden DNA-Basensequenz des Forward-Stranges im 5'-Bereich des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts und der Reverse-Primer aus einer retrograden des Reverse-Stranges im 3'-Bereich. Anfangs wird ein Reaktionsgemisch („Mastermix“) angesetzt, in diesem werden Reaktionspuffer, Dinukleosidtriphosphate, Forward- und Reverse-Primer und Taq-Polymerase zusammengebracht. Jeweils 15µl dieses Gemisches werden auf je 5µl der zu untersuchenden DNA gegeben.

Somit befinden sich im Gesamtvolumen von 20µl:

9,8µl	DEPC-Wasser
2,0µl	PCR-Puffer
1,0µl	dNTP
1,0µl	Forward-Primer
1,0µl	Reverse-Primer
0,2µl	Taq-Polymerase
5,0µl	DNA (á 10ng/µl) = 50ng genomischer DNA

Die Reaktion beginnt mit der initialen Denaturierung bei 95°C über den Zeitraum von 5 Minuten, um die DNA in ihre Einzelstränge aufzuspalten. Die

sich anschließende Zyklusphase gliedert sich in drei zeitlich aufeinander abgestimmte Teilreaktionen mit unterschiedlichen Temperaturen. In jedem dieser Zyklen findet eine Verdopplung der jeweils vorhandenen DNA-Menge statt. Zu Beginn des Zyklus erfolgt die Denaturierung bei 94°C über 4 Minuten. Die nächste Teilreaktion ist die als Hybridisierung (auch „Annealing“ genannt) bezeichnete Anlagerung der Oligonukleotid-Primer bei einer primerspezifischen Temperatur. Diese Temperatur ist zuvor auch mittels der PCR-Methodik über einen Temperaturgradienten (60°C ±10°C) ermittelt worden. Schließlich findet die DNA-Synthese (Elongation) bei 72°C für 30-60 Sekunden statt. Dabei bindet die Taq-Polymerase Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und es werden zwei komplementäre Stränge synthetisiert. Um eine möglichst große Menge DNA zu erhalten, wird dieser Zyklus 30mal wiederholt. Das Ende der PCR ist ein Kettenverlängerungsschritt über 5 Minuten bei 72°C. Der Thermocycler kühlt dann die Proben auf 4°C herunter. Die Lagerung erfolgt bis zur weiteren Verarbeitung der Proben bei 4°C bis -20°C. Abweichungen von diesem Schema werden in dieser Arbeit an entsprechender Stelle kenntlich gemacht.

2.3.3 Kopplungsanalyse per Mikrosatelliten-Polymorphismen

2.3.3.1 Beschreibung

Die Kopplungsanalyse stellt eine molekulargenetische Methode dar, die die Phänomene der Rekombination und der Kopplung zweier Loci im Genom nutzt. Voraussetzung dafür ist, dass die Loci relativ nahe beieinander auf demselben Chromosom lokalisiert sind. Findet während der Meiose eine getrennte Vererbung der Loci statt, so wird dies als Rekombination bezeichnet (Meselson e Radding, 1975). Die Kopplungsanalyse diente vor Abschluss des humanen Genomprojektes mit Publikation der humanen genomischen DNA-Sequenz der Erstellung genetischer Karten. Es können mit ihrer Hilfe aber auch Segregationsanalysen festgelegter genetischer Marker durchgeführt werden (Murray *et al.*, 1994).

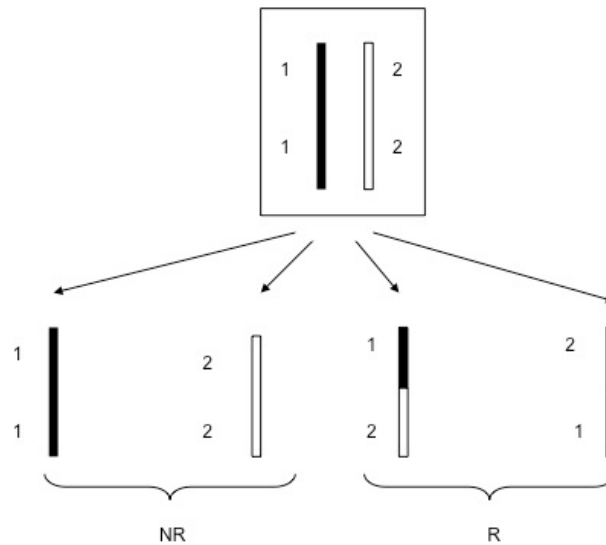


Abbildung 7: Rekombination (R) und Nicht-Rekombination (NR) - vier verschiedene Möglichkeiten der Gametenbildung

Bei diesen Segregationsanalysen handelt es sich um die Analyse einer möglichen Kosegregation des jeweiligen polymorphen Markers mit einer pathologischen Mutation. Damit lässt sich beispielsweise ein Krankheitslocus identifizieren. Zu diesem Zweck werden verschiedene Polymorphismen genutzt (Weber e May, 1989). Alternativ geschieht dies heute zum Teil auch über sogenannte SNP-Arrays. So besteht die Möglichkeit der Lokalisierung eines krankheitsverursachenden Genortes im Genom bei einzelnen Familien. In der vorliegenden Arbeit waren der *SLC12A3*-Genort und auch die krankheitsverursachenden *SLC12A3*-Mutationen bereits bekannt. Die Analyse der Mikrosatelliten-Allele bei Patienten mit spezifischen Mutationen diente der Erstellung gemeinsamer mutations-assoziiierter Haplotypen. Die Ergebnisse lieferten zudem einen Hinweis auf einen gemeinsamen Vorfahren dieser Patienten, einen sogenannten Founder.

Mikrosatelliten sind DNA-Abschnitte, die sich aus 10 bis 60 Kopien von Folgen aus wiederum jeweils 1 bis 6 direkt hintereinander folgenden Basenpaaren zusammensetzen. (Litt e Luty, 1989). Häufige Wiederholungsfolgen sind z.B. die des $(CA)_n$ -Dinukleotids. Solche repetitiven Sequenzen machen etwa 0,5% des Genoms aus. Um gut auswertbare Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, in einem gegebenen Mikrosatelliten eine möglichst hohe Anzahl verschiedener Allele zu finden. Das bedeutet gleichzeitig, dass sich zwei Allele bei einem

Individuum mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Zahl der Dinukleotide unterscheiden. Im menschlichen Genom finden sich tausende Mikrosatelliten, durchschnittlich einmal pro 30 kb-Genomabschnitt. Ein Großteil dieser Satelliten ist bereits beschrieben (Dib *et al.*, 1996) und damit in Gen-Datenbanken abrufbar. Ergänzend zur SNP-Analyse bieten Mikrosatelliten den Vorteil einer bedeutend größeren Allelvielfalt. Dadurch können die bei den Patienten identifizierten Mutationen eindeutig einem bestimmten Allel zugeordnet werden.

Auch die Abschätzung des Alters einer Founder-Mutation kann durch Mikrosatellitenuntersuchung erfolgen. Man sucht hierzu verschiedene Marker mit unterschiedlichem Abstand zu dem ausgewählten Kandidatengen und nutzt die Tatsache, dass die näher zum Gen lokalisierten Marker aufgrund einer geringeren Rekombinationswahrscheinlichkeit über viele Generationen gemeinsam mit einer pathogenen Mutation weitervererbt werden.

Die Marker bzw. Mikrosatelliten wurden mittels PCR amplifiziert und die Fragmente in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

- Sizer 100 Art.# 27-4534A (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Sizer 150 Art.# 27-4535A (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Sizer 200 Art.# 27-4536A (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Sizer 250 Art.# 27-4537A (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Sizer 300 Art.# 27-4531A (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Oligonukleotid-Primer (Fa. MWG, Ebersberg)
- 0,6x TBE-Puffer (120ml 10x TBE ad 2L MQ-H₂O)

2.3.3.3 Durchführung

Voraussetzung für den Erfolg dieser Methode ist die vorherige Auswahl geeigneter polymorpher Marker, der sog. Mikrosatelliten. Einige dieser Marker sollten in enger Umgebung zum Kandidatengen *SLC12A3* zu finden sein, andere wiederum etwas weiter entfernt liegen. Zur Analyse wurden im Rahmen des humanen Genomprojekts identifizierte und lokalisierte Mikrosatelliten verwendet. Diese liegen innerhalb eines Abstandes von zwei Megabasen (2 Mb) um das *SLC12A3*-Gen. In Datenbanken (Ensembl (www.ensembl.org), UCSC (genome.ucsc.edu)) finden sich ausreichend Mikrosatelliten, die sich hinsichtlich Lokalisation und Polymorphizität eignen (UniSTS Database NCBI). Die gewünschten Abschnitte der genomischen DNA mit den ausgewählten Mikrosatelliten werden mittels PCR amplifiziert. Einer der dazu notwendigen Primer (Forward oder Reverse) ist dabei am 5'- bzw. 3'-Ende mit Cyanin-5 fluoreszenzmarkiert, um später eine Detektion der Fragmente zu gewährleisten. Die PCR-Produkte werden nach Amplifikation zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. Dann werden pro Probe 3µl Loading-Dye und jeweils 1µl zweier Größenstandards (sogenannter Sizer), die die Proben flankieren und als sogenannter interner Standard mitlaufen, in einem Eppendorf-Cup als Mastermix angesetzt und in jedes PCR-Tube 5µl vorgelegt. Nun werden je nach ermittelter Menge des PCR-Produkts 0,1 bis 1µl in die Tubes mit dem

angesetzten Mastermix gegeben. Um die Fragmentlängen nach dem elektrophoretischen Lauf zu bestimmen, wird zusätzlich zum zuvor erwähnten internen Standard auch ein externer Standard angesetzt. Dazu werden in ein weiteres PCR-Tube 4µl Loading-Dye mit 4µl des Sizer 50-500 gegeben. Es folgt die Denaturierung der Proben bei 95°C über 5 Minuten, um die Doppelstrang-DNA in Einzelstrang-DNA zu überführen. Nach Beendigung dieses Vorgangs werden die Proben aus dem Thermocycler genommen und direkt auf einen Eisstock gelagert. Das unter UV-Licht ausgehärtete Polyacrylamidgel wird in die dafür vorgesehene Apparatur des Sequenzers gehängt und die dafür vorgesehenen Kammern mit jeweils 1L des 0,6%igen TBE-Puffers befüllt. Der an den Sequencer angeschlossene PC verfügt über eine Kontroll-Software, die den Analysenprozess steuert. Die notwendigen Einstellungen wurden im Vorfeld festgelegt und sind in einem sogenannten Casebook abrufbar und auf jeden Lauf erneut anwendbar. Vor jedem neuen Lauf ist somit lediglich ein Preset des Lasers durchzuführen. Ist das Gel nun in die Apparatur eingehängt, wird der Kamm gezogen und die Taschen mit einer Spritze gut durchgespült, um eventuelle Polyacrylamidreste zu entfernen. Von den 6µl jeder Probe (5µl gemischte Sizer mit Loading-Dye + ca. 1µl PCR-Produkt) werden in jede Tasche des Gels nur 4µl aufgetragen. Die letzte Tasche jedes Gels trägt den externen Standard. Die Laufzeit für ein Gel beträgt 240 Minuten bei o.g. Bedingungen. Die Detektion der Fragmente mittels eines Rotlichtlasers wird computerunterstützt aufgezeichnet (Chadwick *et al.*, 1996).

2.3.3.4 Auswertung

Um die Daten eines jeden Laufes auswerten zu können, wird die Software des Fragment Managers V 1.2 verwendet. Die Daten des jeweiligen Laufs des Sequenzers Alf express werden gespeichert. Mit Hilfe der zwei mitgelaufenen internen Standards in jeder Probe (Sizer 100/150/200/250/300) und des externen Standards werden die einzelnen Graphen, die die Länge der jeweiligen Fragmente darstellen, auf Block gesetzt. Dadurch ist ein Vergleich der Allellänge möglich. Es werden dann die Längen der Allele ermittelt und auf Homozygotie und Heterozygotie geprüft. Die Allele jedes Patienten werden für jeden Patienten entsprechend der Markerlokalisierung notiert und die Haplotypen

erstellt. Man weist dazu jedem Allel innerhalb eines Mikrosatelliten eine laufende Zahl zu, um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten. Das kürzeste Allel trägt dabei die kleinste Zahl, das längste Allel die höchste Zahl.

2.3.4 Single strand confirmation polymorphism (SSCP)

2.3.4.1 Beschreibung

Die Single-Strand Confirmation Polymorphism (SSCP)-Analyse (auch SSCA genannt) dient der Feststellung eines Unterschieds in der Nukleotid-Basensequenz durch eine Mutation bzw. einen Polymorphismus (Orita *et al.*, 1989). Diese Methode hat sich als sensitives Screening erwiesen, um Veränderungen an Genen zu detektieren, die sich meist im Austausch - seltener in Einfügung oder Verlust - einer einzelnen Base manifestiert. Diese Mutationen werden als Punktmutationen bezeichnet.

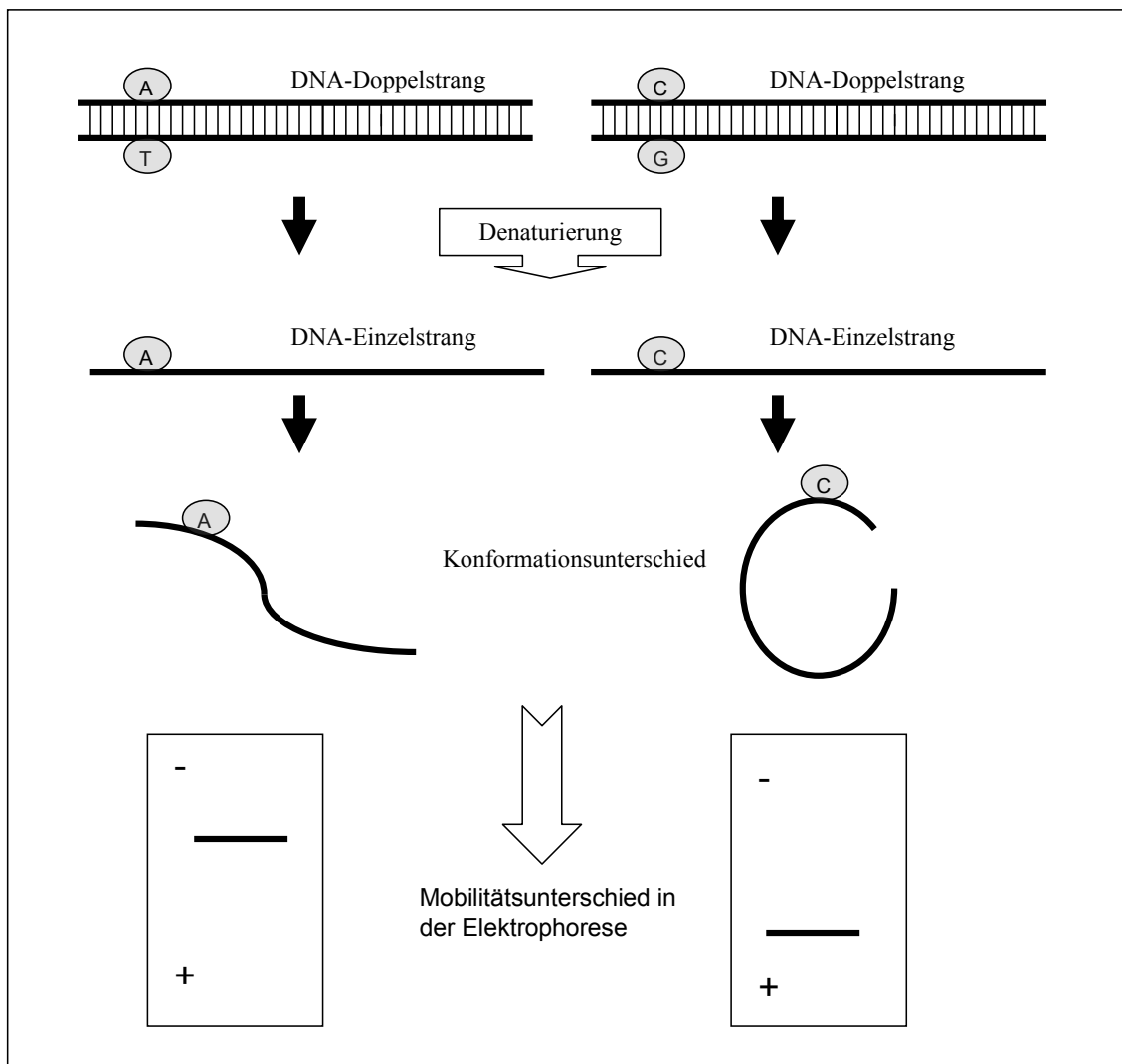


Abbildung 9: schematische Darstellung des Funktionsprinzips der SSCP-Analyse

Das Verfahren der SSCP-Analyse prüft, ob in gleichen Abschnitten denaturierter DNA Unterschiede in den Laufgeschwindigkeiten oder im Laufverhalten im Polyacrylamidgel unter wechselnden Bedingungen wie Änderung der Temperatur, des pH-Werts etc. auffällig werden. Eine Veränderung der räumlichen Anordnung (Konformation) würde durch eine veränderte Nukleotidsequenz (z.B. Basenaustausch) resultieren. Ein Konformationsunterschied wiederum führt zu einem Mobilitätsunterschied im Gel. Grundvoraussetzung für diese Methode ist die Kenntnis der Basensequenz des betreffenden Gens und die Generierung von DNA-Fragmenten mittels PCR. Eine Länge von 300bp sollte dabei nicht überschritten werden. Die zu wählenden Primer liegen im Bereich der Introns, damit eine Abdeckung der

gesamten kodierenden Sequenz und der dazugehörigen Splice-Sites gewährleistet ist.

Die eigentliche Methodik beruht auf einer Gelelektrophorese von PCR-Produkten, die zuvor in DNA-Einzelstränge aufgespalten werden. Die Auswertung der Banden erfolgt nach Beendigung des Laufes durch eine Färbung des Gels mit Silbernitrat. Nachdem die Allelzustände für die SNPs rs12933363, rs12599065, rs4329913 und rs9927820 mit der Methode der ARMS-PCR nicht abschließend und eindeutig geklärt werden konnten, wurde die SSCP-Analyse als alternative Methode angewandt.

Tabelle 5: Sequenzen der Primer für die allelspezifischen ARMS-PCRs

SNP Name	Forward-Primer 1	Reverse-Primer 2	Reverse-Primer2
rs12933363	GGA TCC CTT TTA GCC C	GGA TCC CTT TTA GCC T	CAA GGA GCT CATGCA AC
rs12599065	GAT TCC CCA ACA GTG TC	GAT TCC CCA ATA GTG TT	GCA CTG GAT GAC TGA GA
rs4784733	ATG GTG TCC TGC CTC C	ATG GTG TCC TGC CTC T	CTC TGT TGT GGG CAG T
rs2304480	ATA GAT CAA TAG ACA ATA GAT TAA A	ATA GAT CAA TAG ACA ATA GAT TAA T	AGC CTT CTA CAT CCC ATA
rs4329913	CAG CTG CAG GTC AGA A	CAG CTG CAG GTC AGA G	GGA ATT CCC TTT TCT CTT
rs8043560	CAT GGA TTC ATA CAT TGC	CAT GGA TTC ATA CAT TGT	TTT CCA TCA TAA ACA TGC
rs8063406	CAG ATG GCA ATA AAG AGG	CAG ATG GCA ATA AAG AGT	CCT GTA ATC CCA GCT ACT
rs16963497	CTG CCC CAA GTG AGA T	CTG CCC CAA GTG AGA C	CTC TGA GTA GCT GGG ATT
rs7204044	CAG AGA ATG TTC CTA GGA	CAG AGA ATG TTC CTA GGG	GGA AAC TGA GGC TAG AGA
rs6499860	TGA AGC TTG AAA GTC TGA	TGA AGC TTG AAA GTC TGC	CAG GAG AAA GGG ACA TAG
rs2010501	CCT CCT TTA AAA AGC AAC	CCT CCT TTA AAA AGC AAT	CAA TCA TGC TCA CTG C
rs2399594	AGA CTG GCT CTG ACC TC	GAA TCC CAA AAA TGC AT	GAA TTC CAA AAA TGC AC
rs3794647	AGG AGG CCA GAT CTG C	AGG AGG CCA GAT CTG T	TGG ACA ATG AAT GAA CAG
rs9927820	AAC CTT GCC CCT TCT T	AAC CTT GCC CCT TCT G	TGG CAA TCC AAT AAA ATG

2.3.4.2 Material

- Thermomixer 5436 (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Kühlgenerator Multi Temp[®]III Art.# 18-1102-78 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
- Elektrophoresis Unit Multiphor[®]II Art.# 18-1018-06 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
- Gel Pool Art.# 18-1031-58 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

- Paper Pool Art.# 18-1031-59 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
- Clean Gel DNA Art.# 1001-03 (Fa. ETC, Kirchentellinsfurt)
 - beinhaltet: - Clean Gel 52S Sammelgel (5%)
 - Trenngel (10%)
- DNA Disc Buffer Art.# 1002-19 (Fa. ETC, Kirchentellinsfurt)
- Formamid Art.# 1.09684 (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ethanol 10%: 200ml EtOH abs.+1800ml MQ-H₂O
- Salpetersäure 1%: 30,8 ml HNO₃ 65% in 2L MQ-H₂O
- Silbernitratlösung 0,2%: 4g AgNO₃ in 2L MQ-H₂O
- Natriumcarbonatlösung 3%: 60g Na₂CO₃ in 2 L MQ-H₂O und kurz vor Färbung 50µl Formaldehyd/ 100ml zugeben
- Essigsäure 10%: 200ml CH₃COOH (Eisessig) + 1800ml MQ-H₂O
- Papierelektrodenstreifen

2.3.4.3 Durchführung

Voraussetzung für die Durchführung der SSCP-Analyse ist eine vorangestellte Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragments. Es folgt das Auftragen einiger weniger µl auf ein Agarosegel um Erfolg und der Qualität der PCR zu verifizieren.

In jeweils ein Eppendorf-Cup werden zu gleichen Teilen die PCR-Ansätze (je 3,5µl) und Formamid gemischt. Die Analyse erfolgt im Polyacrylamidgel. Es folgt die Denaturierung der Proben im Heizblock des Thermocyclers für 5min bei 95°C, danach direkte Abkühlung auf Eis für weitere 5min , um dann die PCR-Produkte in die dafür vorgesehenen Taschen des Gels zu pipettieren. Man startet den Lauf des Gels, indem die mit Puffer vollgesogenen Papierelektrodenstreifen mit den entsprechenden Elektroden konnektiert werden und an eine Spannungsquelle anschließt. Bei einer Lauftemperatur von 9°C oder 15°C lässt man die Proben 20min bei 200V, 23mA und 5W ins Sammelgel laufen und anschließend für ca. 60min bei 600V, 30mA und 18W durch das Trenngel laufen.

2.3.4.4 Auswertung

Ist die Elektrophorese abgeschlossen, führt man eine Silbernitratfärbung durch. Diese hat sich durch eine hohe Sensitivität in der Darstellung und durch gute Reproduzierbarkeit bewährt (Heukeshoven e Dernick). Das Gel wird in ein Metallbecken gegeben und zur Fixierung EtOH 10% einmal für ca. 5min inkubiert. Um eine gleichmäßige Färbung des Gels zu erhalten, wird es während aller Abschnitte des Färbeprozesses auf einer Plattform geschwenkt. Nachdem das Ethanol 10% vorsichtig abgegossen ist, folgt das Einlegen in Salpetersäure 1% für 2min. Im Anschluss erfolgt die Silberimprägnierung mit Silbernitratlösung 0,2% für etwa 30min Anwendung. Danach wird das Gel sorgfältig in 3 Waschgängen mit MQ-H₂O gewaschen. Im Anschluss erfolgt der abschließende Entwicklungsschritt durch Zugabe von alkalischem Formaldehyd (200ml Natriumcarbonat 3% + 100µl Formaldehyd), das die Silberionen zu elementarem Silber reduziert. In dieser Lösung wird das Gel solange inkubiert bis die Banden gut sichtbar sind. Die Lösung wird dann ebenfalls abgegossen. Im letzten Arbeitsschritt wird das Gel noch für mindestens 10min in Essigsäure 10% fixiert. Um die überschüssige Feuchtigkeit auf dem Gel zu entfernen, wird es dann im Geltrockner getrocknet.

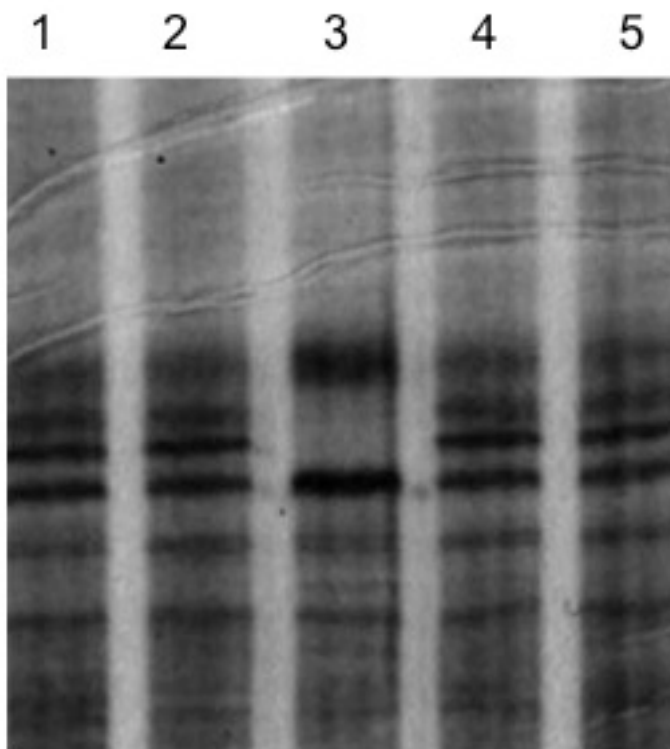


Abbildung 10: SSCP-Auswertung: SNP 2 – rs12599065 – Polymorphismus C/T: Die Proben 1, 2, 4 und 5 zeigen ein Bandenmuster entsprechend einer Heterozygotie für den Polymorphismus, die Probe 3 entspricht einem homozygoten Zustand. Passend hierzu lag bei den Patienten, die die Mutation G741R heterozygot trugen, das mutationsassoziierte Allel "T" heterozygot vor. Patient 3, der homozygot für G741R war, weist auch das mutationsassoziierte Allel "T" homozygot auf.

Zur Auswertung wurden die im Gel sichtbaren Banden den jeweiligen Allelzuständen zugeordnet, nachdem diese einmalig mittels Sequenzierung gesichert worden waren. Hierzu wurden jeweils die Proben von homozygoten Trägern beider Allelzustände sequenziert.

2.3.5 DNA-Sequenzierung

2.3.5.1 Beschreibung

Die DNA-Sequenzierung ist ein molekulargenetisches Verfahren mit dem Ziel der exakten Bestimmung der Basenfolge auf Molekülebene. Klassischerweise erfolgt diese Methode als enzymatischer Kettenabbruch, da sie sich als das verlässlichste und präzise Verfahren erwiesen hat. Hierbei werden DNA-Stränge synthetisiert; der Abbruch erfolgt an einem modifizierten Nukleotid

(Sanger *et al.*, 1977). Voraussetzung für die Sequenzierung ist ein mittels PCR amplifiziertes DNA-Fragment. In Sequenzreaktionen gewinnt man nun durch sich wiederholende Denaturierungs- und Elongationsschritte DNA-Fragmente. Die Länge dieser Fragmente wird gezielt durch die Zugabe von 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) – anstelle von Desoxynukleosidtriphosphaten – abgebrochen, da die Anheftung des nächsten Nukleotidbausteins unterbleibt, wenn ein ddNTP eingebaut wird. Das Verhältnis zwischen dNTP und ddNTP wird so eingestellt, dass im statistischen Mittel in jedem Reaktionsgemisch die Nukleotidkette überall dort abgebrochen wird, wo sich im Normalfall ein Nukleotid, das dem ausgewählten ddNTP entspricht, befindet. Dies führt dazu, dass man am Ende der Sequenzier-Reaktion DNA-Fragmente erhält, die alle mit dem jeweils zugefügten ddNTP enden. Diese werden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Technik der Sequenzierung handelt es sich um eine sogenannte Kapillarsequenzierung. Hierbei erfolgt die Auftrennung der unterschiedlich langen Sequenzierungsprodukte unter sehr hohen Spannungen in einer mit einem speziellen Polymer gefüllten Kapillare. Die Kapillarsequenzierung arbeitet mit fluoreszenz-markierten ddNTPs. Beim Erreichen der so markierten Kettenabburchprodukte am Detektor findet eine durch einen Laser getriggerte Fluoreszenz-Emission der Farbstoffe statt. Durch eine spezielle Kamera kann je nach Farbstoff ein unterschiedliches Emissionsspektrum detektiert werden. Das resultierende Chromatogramm gibt exakt die Sequenz der Basen des sequenzierten Stranges wieder. Das molekulargenetische Verfahren der Sequenzierung fand in unseren Untersuchungen mit der Zielsetzung statt, den Allelzustand der in der SSCP-Analyse dargestellt SNPs zu sichern.

2.3.5.2 Material

- 3730 DNA Analyzer (Fa. Applied Biosystems, CA/ USA)
- E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Classic-Line) Art.# 12-6493-02 (Fa. Peqlab, Erlangen)

beinhaltet: - HiBind®-DNA-Säulen
- 2ml Sammel-Tubes

- XP1-Puffer
- SPW-Waschpuffer
- Oligonukleotid-Primer (Fa. MWG, Ebersberg)

2.3.5.3 Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde jeweils die DNA eines Patienten sequenziert, um den Allelzustand zu sichern. Die im folgenden Abschnitt beschriebene Methodik bezieht sich auf die Nutzung eines automatischen Sequenzierers. Die Sequenzierung setzt sich aus drei Arbeitsabschnitten zusammen: zuerst erfolgt die Amplifikation mittels PCR-Methodik und Aufreinigung des Produkts über eine Säule, dann die Sequenz-Reaktion (Cycle-Sequencing) und zuletzt die Sequenzierung mit anschließender kapillar-elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente. Die PCR erfolgte mit den regulären Oligonukleotid-Primern, welche auch für die vorangegangene SSCP-Analyse verwendet wurden. Die optimalen Temperaturbedingungen sind durch Probe-PCRs mittels Gradienten im Thermocycler etabliert worden.

Im nächsten Arbeitsabschnitt erfolgt die Aufreinigung der PCR-Produkte. In einem ersten Schritt werden zunächst die PCR-Ansätze mit 60µl XP1-Puffer plus 20µl DEPC-H₂O gemischt. Eine HiBind -Zentrifugensäule wird in ein 2ml Sammel-Tube gesteckt und die Mischung aus PCR-Ansatz und XP1-Puffer auf die Säule pipettiert. Es folgt die Zentrifugation für 1min bei 10.000 x g und Raumtemperatur. Der Säulendurchfluss wird verworfen. Man pipettiert jetzt 750µl des Waschpuffers auf die Säule und zentrifugiert erneut unter o.g. Bedingungen. Der Säulendurchfluss wird wiederum verworfen und der Waschschrift wiederholt. Zum Trocknen wird die Zentrifugensäule nun in das geleerte 2ml Sammel-Tube gesteckt und durch einminütiges Zentrifugieren bei 10.000 x g vollständig getrocknet. Zur Elution wird die Zentrifugensäule in ein sauberes 1,5ml Zentrifugenröhrchen gesteckt und 50µl DEPC- H₂O direkt auf die Säule pipettiert. Durch einminütiges Zentrifugieren bei 10.000 x g eluiert man 80% bis 90 % der gebundenen DNA.

Den eigentlichen Prozess des nun folgenden Cycle-Sequencing und die Sequenzierung mit kapillarelektrophoretischer Auftrennung erfolgte bei der Fa. SEQLAB in Göttingen. Zur Vorbereitung der in Göttingen erfolgten

Arbeitsschritte werden jeweils 5µl des per Säule aufgereinigten PCR-Produkts mit 2µl des Forward-Primers gemischt und versandt.

2.3.5.4 Auswertung

Das Ergebnis in Form eines Chromatogramms werden mit dem Programm Chromas V2.13 graphisch dargestellt (<http://technelysium.com.au>). Zur Sequenzanalyse erfolgt ein Vergleich der ermittelten Basensequenz mit der Referenzsequenz des humanen Erbguts mit Hilfe des BLAST-Programms (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). So lässt sich der Allelzustand des entsprechenden SNPs für den jeweiligen Patienten bestimmen.

2.4 Statistik

Da für einige der untersuchten Mutationen nur eine geringe Anzahl Patienten existierten, wurde der Exakte Fisher-Test („Fisher exact test“) zur Berechnung des statistisch signifikanten Unterschieds der Häufigkeiten der detektierten Allele zwischen Patienten und Kontrollen herangezogen. Dieser Test setzt (im Gegensatz zum Chi-Quadrat-Test) keine Mindestanzahl an Allelen voraus, um statistisch signifikante Unterschiede zu beschreiben. Zuverlässige Ergebnisse konnten so auch im Hinblick auf die Mutationen getroffen werden, die nur in einer kleineren Anzahl von Patienten zu finden waren.

3 Ergebnisse

3.1 Mutationsanalyse

Insgesamt waren in Vorarbeiten mit Hilfe der beschriebenen Mutationsanalyse bei 73 Patienten mit dem klinischen Bild eines Gitelman-Syndroms 116 der 146 betroffenen Allele detektiert worden. Im Gegensatz zur Vielzahl (>400) verschiedener Mutationen, die bereits in der Literatur beschrieben sind (Riveira-Munoz, Chang, Bindels, *et al.*, 2007), fand sich in unserem Kollektiv vor allem aus Zentraleuropa stammender Patienten eine auffällige Häufung einiger weniger Mutationen, die bei einer Vielzahl Patienten gefunden wurden (G741R bei 21 Patienten, G439S bei 14 Patienten, C994Y bei 13 Patienten, IVS24(+1)G>T bei 7 Patienten, L859P bei 5 Patienten). Im Einzelnen handelte es sich um vier verschiedene Punktmutationen (G439S, G741R, L859P, C994Y) sowie eine Splice Site Mutation (IVS24+1 G>T). Zusammen machten diese fünf Mutationen 61 der 116 detektierten Allele aus. Sie konnten zusammen bei insgesamt 49 Patienten detektiert werden (Tabelle 4: Patientenkollektiv mit entsprechenden Mutationen). Die häufigste Mutation G741R war allein bei 21 verschiedenen Patienten nachweisbar. Innerhalb der Patientengruppe mit einer der fünf Mutationen gab es zudem einige Patienten, die für eine der genannten Mutationen homozygot waren, aber auch Patienten, die zwei der genannten Mutationen trugen (n=11).

Wie in Abbildung 11 dargestellt, fanden sich bei der Analyse der durch das Mutationsscreening miterfassten kodierenden oder Exon-nahen SNPs (n=5) Hinweise auf spezifische Haplotypen, die mit jeweils einer der fünf Mutationen assoziiert sind. Bei Patienten mit der G439S-Mutation war der A-G-A-A-T Haplotyp nachweisbar. Patienten mit den anderen genannten Mutationen hingegen waren einheitlich mit dem Haplotypen A-A-C-G-C assoziiert. Eine Ausnahme bildete die Patientin 10082. Sie war homozygot für die G439S-Mutation und Trägerin des Haplotypen A-A-C-G-C.

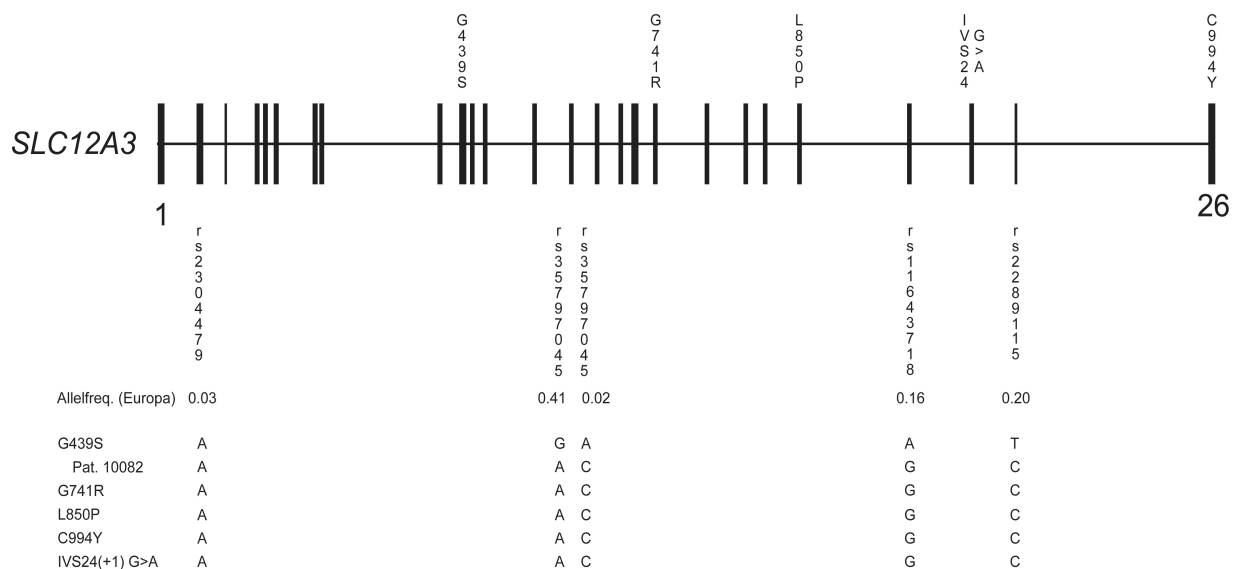


Abbildung 11: SNP-Analyse von 5 SNPs im SLC12A3-Gen: SNP-Analyse von 5 SNPs im SLC12A3 Gen bei Gitelman Patienten mit den Mutationen G439S, G741R, L850P, C994Y, IVS24(+1)G>T Während die G439S-Mutation mit dem A-G-A-A-T Haplotypen assoziiert ist, weisen Patienten mit den übrigen Mutationen uniform den A-A-C-G-C Haplotypen auf. Eine einzige Ausnahme ist Pat. 10082 mit homozygoter G439S Mutation. Sie trägt im Gegensatz zu den übrigen G439S Patienten den A-A-C-G-C Haplotypen. Allelfreq. Europa = vom HapMap-Projekt bei Europäern bestimmte Allelfrequenzen.

3.2 Detaillierte Haplotypisierung

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Ansammlung jeder der fünf Mutationen auf ein immer wiederkehrendes Mutationsereignis an bestimmten Nukleotidpositionen zurückzuführen ist oder ob sie auf ein einziges Mutationsereignis zurückgeht und damit das Ergebnis eines sogenannten Founder-Effekts ist, wurde eine detaillierte Haplotypen-Karte erstellt. Dies erfolgte sowohl durch Genotypisierung einer repräsentativen Anzahl von tagSNPs innerhalb des SLC12A3-Gens, als auch durch die Analyse von Mikrosatelliten, die in der Umgebung des SLC12A3-Genortes liegen. Dazu wurden 21 Patienten mit den Mutationen G741R, 13 Patienten mit G439S, 12 Patienten mit C994Y, 7 Patienten mit IVS24-splice-site Mutation und 5 Patienten mit L859P herangezogen. Die Differenz zu der in Abschnitt 3.1 genannten Patientenanzahl entstand, da von jeweils einem Mutationsträger der Mutationen G741R, G439S und C994Y kein DNA-Material mehr vorhanden war.

Tabelle 6: mutationsassoziierte Haplotypen der fünf untersuchten Mutationen G741R, G439S, C994Y, IVS24(+1)g>t, L859P: *= CEPH-Kohorte (n=60, www.hapmap.org)

Mutation	mut.-assoz. Haplotyp	Frequenz in Normalbevölkerung*
G741R	T-T-T-C-C-G-G-G-G-A-A-A-G-A	5.0%
G439S	C-T-T-C-T-T-A-A-G-C-G-G-A-A	5.0%
C994Y	T-T-T-C-C-G-G-G-G-A-A-A-G-A	5.0%
IVS24(+1)g>t	T-C-T-C-T-G-G-A-G-A-G-A-A-A	0.0%
L859P	C-T-T-C-C-G-G-G-?-A-A-A-G-A	11.7%

Die SNP-Genotypisierung bei homozygoten und compound-heterozygoten Mutationsträgern, sowie die Hinzunahme von Haplotypen homozygoter Loci bei einzelnen Mutationsträgern, brachten spezifische mutations-assoziierte Haplotypen für alle fünf Mutationen (G741R, G439S, C994Y, IVS24, L859P) hervor, die - mit einer Ausnahme (Patientin 10082, s.u.) - bei allen Mutationsträgern vorlagen.

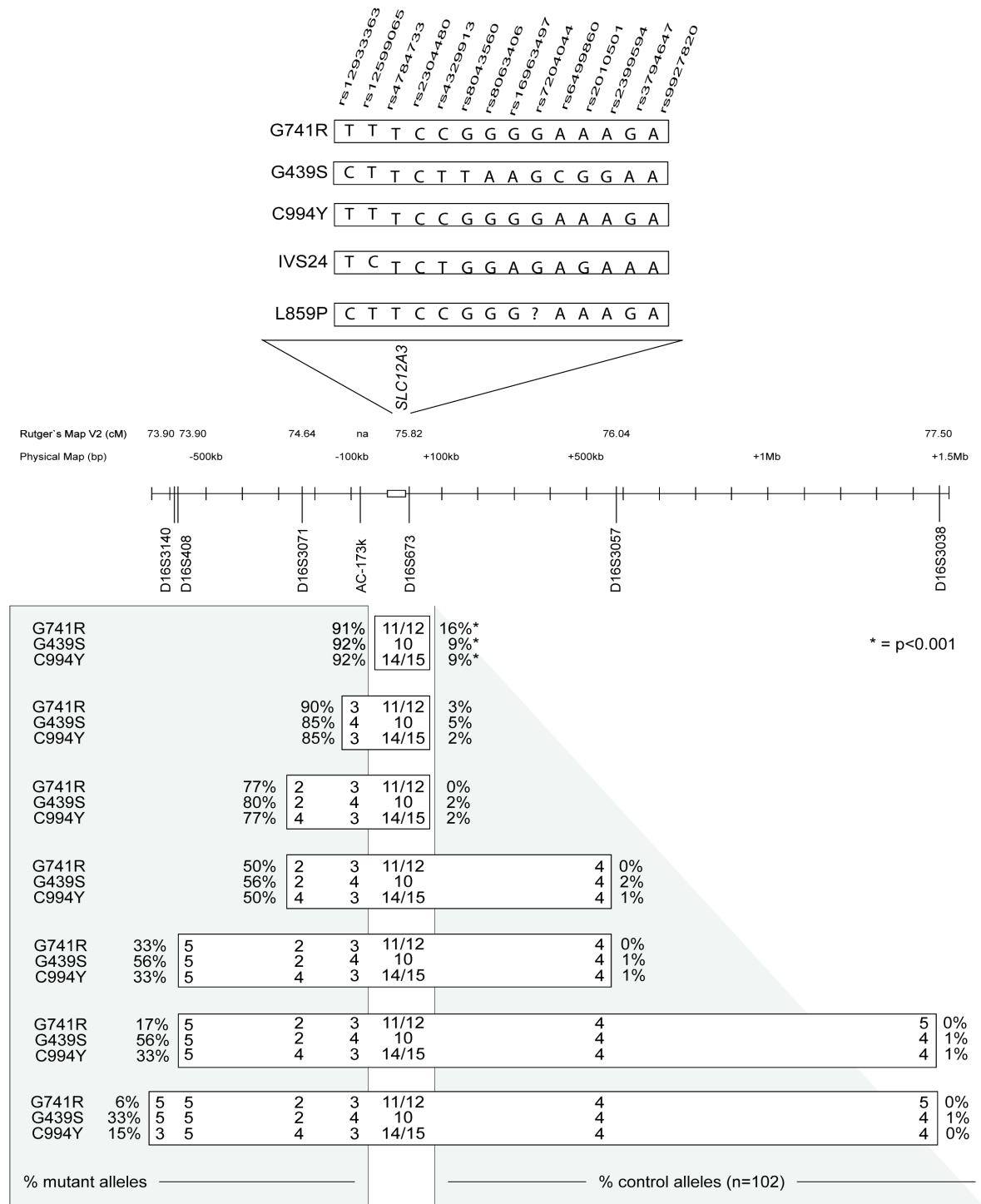


Abbildung 12: Haplotypenanalyse bei Mutationsträgern von G741R, G439S, C994Y, IVS24(+1)G>T, L859P: Mit G741R, G439S, C994Y, IVS24(+1)G>T und L859P assoziierte Haplotypen. Im oberen Teil sind die SNP-basierenden Haplotypen innerhalb des *SLC12A3*-Gens für alle fünf Mutationen dargestellt. Die Träger jeder der fünf Mutationen weisen einheitlich die angegebenen, assoziierten Haplotypen auf. Die SNP-basierenden Haplotypen werden ergänzt durch eine Analyse von 7 Mikrosatelliten-Markern in der Umgebung des *SLC12A3*-Gens (insgesamt eine genetische Distanz von 3,6cM umspannend). Im unteren Teil sind die Prävalenzen der Haplotypen bei den Trägern der Mutationen G439S, G741R und C994Y angegeben. Die Gesamtzahl der unterschiedlichen Allele für die untersuchten Mikrosatelliten waren Folgende: $n=17$ für D12S673, $n=5$ für AC-173k, $n=4$ für D12S3071, $n=8$ für D12S3057, $n=6$ für D12S408, $n=5$ für D12S3038 und $n=18$ für D12S3140). Ein großer Prozentsatz der Patienten (links) weist im Gegensatz zu den Kontrollallelen ($n=102$, rechts) einen gemeinsamen Haplotypen auf.

Die Gegenüberstellung der identifizierten Haplotypen mit Haplotypen, die bereits in der CEPH-Kohorte bestimmt und durch die HapMap-Arbeitsgemeinschaft ausgewertet wurden, zeigte, dass die mutations-assoziierten Haplotypen der Mutationen G741R, G439S, C994Y und L859P in der europäischen Allgemeinbevölkerung mit einer Häufigkeit von 5%, 5%, 5% (6/120 Allelen) beziehungsweise 11,6% (14/120 Allelen) vorkommen (Zitat: www.hapmap.org).

Für die Mutationen G741R und C994Y konnte ein identischer, mutations-assoziiertes Haplotyp ausfindig gemacht werden. Träger der G439S Mutation weisen ebenfalls einen gemeinsamen mutations-assoziierten Haplotyp auf, der in der CEPH-Kohorte vorkommt. Im Gegensatz dazu haben Träger der Mutation IVS24(+1)G>T einen gemeinsamen Haplotypen, der in der CEPH-Kohorte nicht vorkommt (www.hapmap.org). Für die Mutation L859P konnte ebenfalls ein mutations-assoziiertes Haplotyp identifiziert werden. Da sich jedoch nur fünf Patienten in unserer Kohorte befanden, die die L859P-Mutation lediglich heterozygot aufwiesen, blieb der zugehörige Haplotyp für einen der 14 analysierten SNPs (rs7204044) ungeklärt. Bei jeder der fünf Mutationen ließen sich die gemeinsamen Haplotypen bei allen Mutationsträgern in Übereinstimmung nachweisen; Eine Ausnahme bildete die Patientin 10082, die homozygot für die G439S-Mutation und Trägerin des abweichenden Haplotypen A-A-C-G-C ist.

Die auf SNPs basierende Haplotypen-Analyse wurde ergänzt durch die Untersuchung von sieben polymorphen Mikrosatelliten-Markern, die das *SLC12A3*-Gen um 3,6 cM, entsprechend 2,1 Mb der physikalischen genomischen Sequenz, umspannen (Kong *et al.*, 2004; Kong e Matise, 2005).

Tabelle 7: Mikrosatellitenanalyse bei Trägern der G741R Mutation im Vergleich zu 51 gesunden Kontrollpersonen

Mikrosatelliten	Allel(e)	Patienten/ mutierte Allele (n=22)	Kontrollen/ Allele (n=102)	Fisher-Exact-Test
D16S673	11/12	20/22 (90.9%)	17/102(16.7%)	p<0.001
Ac-173k+D16S673	3 + 11/12	19/21 (90.5%)	4/102 (3.9%)	p<0.001
D16S3071 + Ac-173k + D16S673	2 + 3 + 11/12	16/21 (76.2%)	1/102 (1.0%)	p<0.001

Tabelle 8: Mikrosatellitenanalyse bei Trägern der G439S Mutation im Vergleich zu 51 gesunden Kontrollpersonen

Mikrosatelliten	Allel(e)	Patienten/ mutierte Allele (n=14)	Kontrollen/ Allele (n=102)	Fisher-Exact-Test
D16S673	10	12/14 (85.7%)	9/102(8.8%)	p<0.001
Ac-173k+D16S673	4 + 10	11/14 (78.6%)	5/102 (4.9%)	p<0.001
D16S3071 + Ac-173k + D16S673	2 + 4 + 10	8/11 (72.7%)	2/102 (2.0%)	p<0.001

Tabelle 9: Mikrosatellitenanalyse bei Trägern der C994Y Mutation im Vergleich zu 51 gesunden Kontrollpersonen

Mikrosatelliten	Allel(e)	Patienten/ mutierte Allele (n=12)	Kontrollen/ Allele (n=102)	Fisher-Exact-Test
D16S673	14/15	12/12 (100%)	9/102 (8,8%)	p<0.001
Ac-173k+D16S673	3 + 14/15	11/12 (91,7%)	2/102 (2,0%)	p<0.001
D16S3071 + Ac-173k + D16S673	4 + 3 + 14/15	10/12 (83,3%)	2/102 (2,0%)	p<0.001

Tabelle 10: Mikrosatellitenanalyse bei Trägern der IVS24(+1)G>T Mutation im Vergleich zu 51 gesunden Kontrollpersonen

Mikrosatelliten	Allel(e)	Patienten/ mutierte Allele (n=7)	Kontrollen/ Allele (n=102)	Fisher-Exact-Test
D16S673	11	4/7 (57,1%)	8/102 (7,8%)	p<0.01
Ac-173k+D16S673	5 + 11	4/7 (57,1%)	3/102 (2,9%)	p<0.01
D16S3071 + Ac-173k + D16S673	2 + 5 + 11	4/7 (57,1%)	2/102 (2,0%)	p<0.01

Tabelle 11: Mikrosatellitenanalyse bei Trägern der L859P Mutation im Vergleich zu 51 gesunden Kontrollpersonen

Mikrosatelliten	Allel(e)	Patienten/ mutierte Allele (n=5)	Kontrollen/ Allele (n=102)	Fisher-Exact-Test
D16S673	16	3/5 (60%)	3/102 (2,9%)	p<0.001
Ac-173k+D16S673	3 + 16	2/5 (40%)	1/102 (1,0%)	p<0.01
D16S3071 + Ac-173k + D16S673	3 + 3 + 16	2/5 (40%)	0/102 (0%)	p<0.01

Auch hier konnten gemeinsame Kern-Haplotypen für jede der fünf Mutationen nachgewiesen werden. Besonders der Marker D16S673, der sich nur 10kb vom 3' Ende des *SLC12A3*-Gens befindet, zeigte hoch polymorphe Allele (n=17). Für Mutationsträger der Mutationen G741R und C994Y wurden jeweils zwei ähnlich große D16S673-Allele (11 und 12 bzw. 14 und 15) als mutations-assoziiert gewertet, da jedes Allel in einer vergleichbaren Anzahl von Mutationsträgern nachgewiesen werden konnte. Solch seltene benachbarte Allele können durch weitere spontane Mutationsereignisse in Mikrosatellitenmarkern mit repetitiven Sequenzen entstehen (Becker *et al.*, 2007). Das fast gleiche prozentuale Vorkommen von jeder der zwei speziellen Allele deutet dabei auf ein weit zurückliegendes Mutationsereignis der Mikrosatelliten hin, das kurz nach dem Mutationsereignis der kosegregierenden *SLC12A3*-Genmutation beim Founder-Individuum liegt. Alle vier mutations-assoziierten D16S673-Allele (je zwei für G741R und C994Y) sind recht selten in

den Kontrollen nachweisbar (16% für G741R und 9% für C994Y). Die Untersuchung der beobachteten Unterschiede der Häufigkeit der Allelfrequenzen bei den Mutationsträgern im Vergleich zu den gesunden Kontrollen auf statistische Signifikanz, erfolgte mittels des Exakten Fisher-Tests („Fisher exact test“). Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse bei Trägern der Mutationen G741R, G439S und C994Y sind ausnahmslos hoch signifikant ($p < 0,001$). Die statistische Auswertung der Kern-Haplotypen der Mutation IVS24(G>T) erbrachte ein sehr signifikantes Ergebnis ($p < 0,01$). Für Träger der Mutation L859P konnte für den gennahsten Mikrosatelliten D16S673 auch ein hohes Signifikanzniveau ($p < 0,001$) berechnet werden. Die Analyse der Mikrosatelliten, welche in einem zunehmend größeren Abstand zum Gen liegen (AC-173 und D16S3071), erbrachte eine sehr signifikante Abweichung der Allelfrequenzen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($p < 0,01$).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass mittels SNP-Genotypisierung und Mikrosatellitenanalyse bei allen Patienten mit den fünf untersuchten, gehäuft auftretenden Mutationen G439S, G741R, L859P, IVS24(+1)G>T und C994Y mutations-assoziierte Haplotypen nachgewiesen werden konnten.

4 Diskussion

Als Basis der vorliegenden Arbeit wurde eine Mutationsanalyse des *SLC12A3*-Gens bei 73 nicht miteinander verwandten Patienten mit Gitelman-Syndrom aus verschiedenen zentraleuropäischen Ländern durchgeführt. Dabei konnten 116 von 146 mutierten Allelen identifiziert werden. Diese Daten sind vergleichbar mit Ergebnissen vorheriger Publikationen mit einer Detektionsrate von 80% (Riveira-Munoz, Chang, Godefroid, *et al.*, 2007). Wie bereits beschrieben, ist bei einigen Patienten mit autosomal-rezessiv vererbtem Gitelman-Syndrom nur eine von zwei pathologischen Mutationen detektierbar. Dass das zweite mutierte Allel nicht aufzufinden ist, liegt möglicherweise an unserer Screeningmethode (SSCP). Die beschriebene Sensitivität dieser Methode liegt bei 80%. Andere mögliche Erklärungen schließen die Existenz von heterozygoten Deletionen oder Mutationen in nicht-kodierenden Bereichen außerhalb der untersuchten kodierenden Sequenz des *SLC12A3*-Gens ein. Diese Detektionsrate muss als mögliche Selektionsverzerrung bei der Beurteilung von immer wiederkehrenden Mutationen in Betracht gezogen werden.

Im Gegensatz zur großen Anzahl (>400) verschiedener Mutationen, die bereits in der Literatur beschrieben sind (Riveira-Munoz, Chang, Bindels, *et al.*, 2007), findet sich in unserem Kollektiv vor allem aus Zentraleuropa stammender Patienten, eine auffällige Häufung einiger weniger Mutationen, die bei der Mehrheit der Patienten gefunden wurden. Interessanterweise machten fünf verschiedenen Mutationen, nämlich G741R, G439S, C994Y, IVS 24(+1)G>T und L859P, mehr als die Hälfte aller GS-Allele in unserer Kohorte aus.

G741R, die am häufigsten detektierte Mutation in unserer Kohorte, konnte in 22 mutierten Allelen nachgewiesen werden. Das entspricht 19% der 116 identifizierten GS-Allele oder 15% aller 146 erwarteten GS-Allelen bei 73 Patienten. Diese Mutation wurde bereits in den Niederlanden als häufig beschrieben (Lemmink *et al.*, 1996) und in einer erheblichen Anzahl von Patienten in einer großen Kohorte in den Vereinigten Staaten von Amerika (Allelwiederholungsrate 13%) (Ji *et al.*, 2008).

Alle fünf Mutationen konnten bereits zuvor bei Patienten europäischer Abstammung beschrieben werden (Simon, D. *et al.*, 1996; Riveira-Munoz, Chang, Godefroid, *et al.*, 2007). In der oben genannten großen Studie mit Patienten aus überwiegend europäischer Abstammung (n=297) konnten R. Lifton und seine Mitarbeiter alle fünf Mutationen zwar in signifikanter Frequenz nachweisen, die Mutationen G741R, G439S und besonders C994Y waren jedoch deutlich seltener zu verzeichnen als in unserer Kohorte. Die Mutation IVS24(+1)G>T konnte in dieser Studie gar nicht nachgewiesen werden (Ji *et al.*, 2008). Unsere Daten zusammen mit den genannten Publikationen weisen daraufhin, dass die fünf untersuchten Mutationen ihren Ursprung wahrscheinlich in verschiedenen Teilen Europas haben. Die vermehrten Häufigkeiten für G741R, G439S und C994Y in unserer Studienkohorte weisen auf einen Ursprung in Zentraleuropa hin, z.B. deutsch-sprachige Länder oder die Niederlande.

Tabelle 12: Vergleich der prozentualen Häufigkeit der Allelträger einer der fünf untersuchten Mutationen mit der Kohorte von Ji et al. 2008 (Ji et al., 2008)

Mutation	Allelträger eigene Arbeit		Allelträger Arbeit Ji et al.	
	Σ n=73		Σ n=297	
	Allelträger (n)	Allelträger (%)	Allelträger (n)	Allelträger (%)
G741R	21	28,8	32	10,8
G439S	14	19,2	10	3,4
C994Y	13	17,8	3	1
IVS24(+1)G>T	7	9,6	0	0
L859P	5	6,8	11	3,7

Nach derzeitigem Wissensstand hat bisher keine veröffentlichte Studie eine Haplotypenanalyse bei Mutationsträgern der fünf von uns untersuchten Mutationen durchgeführt. Die Kombination der auf SNP und Mikrosatelliten basierenden Haplotypenkonstruktion zeigte gemeinsame Kernhaplotypen für alle fünf Mutationen. Die statistische Auswertung mit Vergleich der Allelfrequenzen der Haplotypen zwischen Mutationsträgern und Kontrollpersonen (eigenes Kontroll-Kollektiv bzw. CEPH-Kohorte) zeigt eine signifikante Assoziation der identifizierten Haplotypen mit den entsprechenden Mutationen. Dies spricht gegen wiederholt auftretende Mutationseignisse als

Ursache der beobachteten Mutationshäufung (sogenannte Mutational Hotspots). Die Annahme eines Founder-Effekts wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass diese Mutationen nicht bei Patienten mit anderem/ nicht-europäischen ethnischen Ursprung beobachtet wurden, z.B. asiatischen Patienten (Monkawa *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2003; Maki *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2008). Lediglich eine Patientin (Nr. 10082), die die Mutation G439S in homozygotem Zustand auswies, zeigte sowohl in der SNP-Analyse, als auch in der Mikrosatelliten-Analyse einen vom mutations-assoziierten Haplotypen abweichenden Haplotypen. Dieser Befund spricht für ein unabhängiges Mutationsereignis zumindest bei dieser Patientin.

Hinsichtlich Gitelman-Mutationen bei Kaukasiern, konnten die Mutationen G741R und IVS24(+1)G>T nicht bei Patienten aus Südeuropa festgestellt werden. Die Mutation C994Y hingegen konnte zuerst bei zwei Patienten aus Italien identifiziert werden. Die Region oder Provinz sind nicht bekannt (Syrén *et al.*, 2002). Die Mutation L859P konnte auch bei einem aus Spanien stammenden Patienten identifiziert werden (García Pérez *et al.*, 2008). Auch einer der Patienten aus unserer Kohorte mit der L859P-Mutation ist spanischen Ursprungs, weist aber nichtsdestotrotz den gemeinsamen Kernhaplotypen der L859P-Mutationsträger auf. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die Mutation G741R auch in Schweden auftritt (Fava *et al.*, 2007).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die beschriebenen Beobachtungen der geographischen Erscheinungen innerhalb Europas möglicherweise auf je einen gemeinsamen Vorfahren in verschiedenen Regionen innerhalb Zentraleuropas hinweisen.

Periodisch auftretende Mutationen mit geographischer oder ethnischer Häufung wurden auch schon bei weiteren Genen beobachtet, die am renalen Salztransportsystem beteiligt sind. Beispielsweise wurde die A204T-Mutation im *CLCNKB*-Gen, die zum klassischen Bartter Syndrom (cBS) führt, bei zwei unabhängigen Gruppen von spanischen Patienten gefunden (Rodríguez-Soriano *et al.*, 2005; Gorgojo *et al.*, 2006). Ebenso scheint die Mutation W625X

im *NKCC2*-Gen für die Mehrheit der Fälle des antenatalen Bartter-Syndroms (aBS) in Costa Rica verantwortlich zu sein (Kurtz *et al.*, 1997).

Des Weiteren konnte für die Mutation IVS9(+1)G>T, die als häufige Mutation im *SLC12A3*-Gen auftritt, eine starke Häufung bei Patienten aus der Volksgruppe der Roma („Gypsy“) beobachtet werden. Ein Founder-Effekt wurde vermutet, jedoch wurden keine Haplotypdaten erhoben (Coto *et al.*, 2004).

Die Beobachtung immer wiederkehrender Mutationen bei GS-Patienten erlaubt möglicherweise in Zukunft detailliertere Genotyp-Phänotyp-Korrelationen. Diese Betrachtungen wurden bislang durch die große Variabilität der *SLC12A3*-Mutationen und auch durch das Erscheinen im compound-heterozygoten Status bei den meisten europäischen Patienten erschwert.

Hingegen wurde in der Vergangenheit belegt, dass die Phänotypen des Gitelman-Syndroms besonders heterogen in Bezug auf das Alter, die Schwere der biochemischen Auffälligkeiten und klinischen Manifestation sind (Bettinelli *et al.*, 1998; Riveira-Munoz, Chang, Bindels, *et al.*, 2007; Balavoine *et al.*, 2011). Insbesondere die Variabilität der Phänotypen wurde nicht nur unter den nicht miteinander verwandten Patienten, die dieselbe Mutation tragen, dokumentiert (Coto *et al.*, 2004), sondern auch innerhalb betroffener Mitglieder einzelner Familien (Jeck *et al.*, 2000). Auch Lin *et al.* beschrieben zwei Familien mit genetisch gesichertem GS. Bei den männlichen Probanden war die Hypokaliämie deutlich ausgeprägter nachweisbar und sie fielen durch Lähmungserscheinungen auf. Die weiblichen Familienmitglieder hingegen waren asymptomatisch (Lin *et al.*, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte keine detaillierte Auswertung des Phänotyps der untersuchten Patienten. Eine solche Auswertung könnte möglicherweise Rückschlüsse auf eine unterschiedliche Ausprägung des Krankheitsverlaufs bei Patienten mit einer der fünf Mutationen erlauben (Genotyp-Phänotyp-Korrelation). So könnte man beispielsweise auch Blutdruckdaten der betroffenen Patienten versuchen zu korrelieren (Fava *et al.*, 2008).

Darüber hinaus könnte die Kenntnis mutations-assoziiierter *SLC12A3*-Haplotypen die Zuordnung von Haplotypen bei heterozygoten Mutationsträgern erleichtern, bei denen Blutdruckwerte erhoben wurden (Fava *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2008).

Bei der Mutation IVS24(+1)G>T haben Riveira-Munoz und Kollegen drastisch reduzierte mRNA-Level der abweichend gespleißten Kopie nachgewiesen (~10% der wildtyp-Transskriptmenge). Eine mögliche Ursache für solch verringerte RNA-Mengen ist ein sogenannter "Nonsense-mediated Decay", also ein Abbau der fehlerhaften RNA als Teil der intrazellulären Qualitätskontrolle der Transkription (Riveira-Munoz, Chang, Bindels, *et al.*, 2007).

De Jong und Mitarbeiter beschrieben funktionell die drei Missense-Mutationen, die am häufigsten in dieser Studie auftraten: G741R und G439S gehören zu einer Klasse von Mutationen (Klasse I) ohne signifikante Natriumaufnahme im *Xenopus laevis*-Expressionssystem. Beide Mutationen verblieben überwiegend im Cytoplasma und/oder am Prä-Golgi Komplex, was auf einen defekten Transport an die Zellmembran (sogenanntes defektes „Trafficking“) hinweist. Im Gegensatz dazu ist die Klasse II-Mutation C994Y signifikant an der Zelloberfläche nachweisbar, jedoch ist die Natriumaufnahme deutlich reduziert (~50% im Vergleich zum Wildtyp NCCT). Da nur eine kleine Kohorte (3 Patienten mit Klasse I-Mutation und 5 Patienten mit Klasse II-Mutation) untersucht wurde, war eine Schlussfolgerung bezüglich einer Genotyp- / Phänotyp-Korrelation nicht möglich (De Jong *et al.*, 2002).

Bezüglich des Alters könnten die Mikrosatelliten-Daten Hinweise auf den Ursprung der identifizierten gemeinsamen GS-Mutationen liefern. Eine mögliche Erklärung für die Häufigkeit von heterozygoten Trägern des Gitelman-Syndroms und besonders der sich wiederholenden oder gemeinsamen *SLC12A3*-Mutationen könnte ein Selektionsvorteil sein, der durch Unterschiede in der renalen Salzverarbeitung übertragen wird. Das Weiterbestehen und die weite Verbreitung der fünf Mutationen im heterozygoten Status in einem signifikanten Prozentsatz in der europäischen Population (Häufigkeit heterozygoter GS insgesamt geschätzt ~1%, Prävalenz der fünf Mutationen in

EXaC („Exome Aggregation Consortium“ (<http://exac.broadinstitute.org>) Allelfrequenz = 0.0018, Heterozygote damit 0.36%) weist möglicherweise auf einen evolutionären Vorteil im Hinblick auf reduzierte NCCT-Aktivität und erniedrigten Blutdruck hin.

Tabelle 13: Häufigkeit der fünf untersuchten Mutationen in EXaC

Mutation	Häufigkeit der Mutation
G741R	0.0006344
G439S	0.0004109
IVS24+1G>T	0.0002858
L859P	0.0001561
C994Y	0.0003147
Σ	0.0018 \triangleq knapp 2‰

Für das *SLC12A3*-Gen konnte gezeigt werden, dass ein heterozygoter Trägerstatus in Zusammenhang mit erniedrigten Blutdruckwerten bei unabhängigen Kohorten steht (Fava *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2008). Dieser Effekt legte die Vermutung nahe, dass dadurch zumindest im postreproduktiven Alter ein gesundheitlicher Nutzen entstehen könnte. Diese Aussage wird durch epidemiologische Studien in Bezug auf den Blutdruck und die Mortalität untermauert. Die Arbeitsgruppe um R. Lifton konnte anhand einer großen Kohorte aus der Framingham Heart Study zeigen, dass inaktivierende Mutationen in verschiedenen Proteinen, die für die renale Salzreabsorption zuständig sind, im heterozygoten Zustand mit signifikant erniedrigtem Blutdruck einhergehen. Obendrein zeigen auch randomisierte Studien eine reduzierte Mortalität bei mit Thiaziden behandelten Patienten, also Medikamenten, die den NCCT hemmen (Ji *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu dieser Hypothese des theoretischen Blutdruckvorteils, der durch die erhöhte renale Salzausscheidung und die daraus resultierende negative Salzbilanz bedingt ist, wird in einer in 2013 veröffentlichten Studie paradoxerweise eine GS-Kohorte mit hypertensiven Blutdruckwerten beschrieben. Es wird vermutet, dass dies Folge eines chronischen sekundären Hyperaldosteronismus sein könnten (Berry *et al.*, 2013).

Zusammengefasst weist diese Arbeit eine wichtige Rolle einer kleinen Anzahl von *SLC12A3*-Mutationen für die Pathogenese des Gitelman-Syndroms in Zentraleuropa nach. Eine solche Häufung einiger weniger pathogener Mutationen ermöglicht potentiell ein zielorientierteres und kostengünstigeres Mutationsscreening. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die beobachtete Mutationshäufung in unserer Patientenkohorte die Konsequenz einzelner, vermutlich lang zurückliegender Mutationseignisse bei gemeinsamen Vorfahren ist. Im Anschluss an diese einzelnen Mutationseignisse erfolgte dann vermutlich eine breite Verteilung der Mutation zusammen mit den nachgewiesenen mutationszugehörigen Haplotypen über große Teile von Zentraleuropa. Leider konnte bislang keine genauere Altersberechnung der initialen Mutationseignisse erfolgen.

Die Kenntnis der *SLC12A3*-Haplotypen wird hoffentlich zukünftige Genotyp-Phänotyp-Studien bei heterozygoten Trägern der Gitelman-Syndrom-Allele und auch damit verbundene Studien in Bezug auf die Beteiligung des *SLC12A3*-Gens an kardiovaskulären Erkrankungen vereinfachen.

5 Zusammenfassung

Das Gitelman-Syndrom wurde vor ungefähr 50 Jahren erstbeschrieben und ist eine laborchemisch durch hypokaliämische Alkalose, Hypokalziurie und Hypomagnesiämie charakterisierte renale Salzverlusterkrankung, die sich meist im Jugend- oder Erwachsenenalter mit Adynamie, Muskelkrämpfen und eher mildem Salzverlust manifestiert. Die autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung wird durch inaktivierende Mutationen im *SLC12A3*-Gen verursacht, das für den NaCl-Cotransporter NCCT im distalen Konvolut (DCT) des Nierentubulus kodiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine genetische Charakterisierung eines großen Kollektivs von 73 GS-Patienten aus nicht verwandten Familien durchgeführt. Es konnten interessanterweise bei knapp zwei Dritteln der Patienten mindestens eine von fünf pathogenen Mutationen (G741R, G439S, C994Y, IVS24(+1)G>T, L859P) detektiert werden. 11 Patienten (15%) trugen sogar zwei der fünf genannten Mutationen in entweder compound-heterozygotem oder homozygotem Zustand. Darüber hinaus konnten 43 weitere Mutationen identifiziert werden. Damit liegen dem Gitelman-Syndrom bei der Mehrzahl der europäischen Patienten einige wenige pathogene Mutationen zugrunde, die mit Hilfe eines einfachen Algorithmus leicht detektiert werden können. Diese Erkenntnisse könnten trotz neuer Entwicklungen in der Gendiagnostik mit der Nutzung von Hochdurchsatzverfahren ("Next-Generation-Sequencing") ein zeit- und kosteneffizientes Erstscreening des *SLC12A3*-Gens bei Patienten mit GS ermöglichen, welches primär die diese fünf Mutationen enthaltenden Genabschnitte untersucht. Dieses hätte in dem untersuchten Kollektiv bei fast 80% der Patienten mindestens eine krankheitsrelevante Mutation detektiert. Der Nutzen dieses vereinfachten Screening-Algorithmus wurde zudem durch eine retrospektive Auswertung des Mutationsspektrums einer großen amerikanischen GS-Patientenkohorte überprüft.

Um die Ursache der beobachteten Mutationshäufung zu klären, wurden Haplotypen-Untersuchungen mittels SNP- und Mikrosatelliten-Analysen bei Patienten durchgeführt, die mindestens eine der fünf genannten Mutationen

trugen. Diese konnten für alle fünf Mutationen einen mutationsassoziierten Haplotyp identifizieren. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass der Mutationshäufung nicht wiederkehrende Mutationsereignisse zugrunde liegen, sondern vermutlich ein singuläres, zeitlich weit zurückliegendes Mutationsereignis bei einem gemeinsamen Vorfahren („Founder“).

6 Englische Zusammenfassung

Gitelman syndrome (GS) was first described about 50 years ago and is a renal salt-losing tubulopathy, biochemically characterized by hypokaleamic alkalosis, hypocalicuria and hypomagnesiemia which appears first in adolescence or adulthood with adynamia, muscle cramps and rather modest loss of salt. This autosomal recessive disease is caused by inactivating mutations in the *SLC12A3*-gene which encodes for the NaCl-Cotransporter NCCT in the distal convoluted (DCT) of the renal tubule system.

In this present paper a genetic characterization of a large cohort of 73 GS patients who are not related to each other was performed. Interestingly, at least one out of five pathologic mutations (G741R, G439S, C994Y, IVS24(+1)G>T, L859P) were detected in almost two-thirds of the patients. 11 patients (15%) were even carrying two of the five mentioned mutation either in a compound heterozygotic or homozygotic state. Furthermore, 43 additional mutations could be identified. Considering these facts, the majority of the European patients underlies only a few pathogenetic mutations which can be detected with the help of a simple algorithm. Despite new developments in the genetic diagnostics using high-throughput screening (next-generation-sequencing), a time- and cost-efficient initial screening of the *SLC12A3*-gene for patients with GS, which primarily analyses those parts of the gene containing the five mutations, can be made possible. This screening method would have detected at least one disease relevant mutation in almost 80% within the scanned cohort. The use of this simplified screening algorithm was verified by a retrospective analysis of the mutational spectrum of a great American GS-cohort.

To resolve the reason for the observed mutational accumulation, haplotypes researches using SNP- and microsatellite tests were executed in patients carrying at least one of the mentioned five mutations. For all of the five mutations a mutation-associated haplotype could be identified. Hereby it could be shown that the mutational accumulation does not underlie recurrent mutational events, but rather are a singular mutational event which occurred many years ago in a common ancestor („founder“).

7 Literaturverzeichnis

BALAVOINE, A. S. et al. Phenotype-genotype correlation and follow-up in adult patients with hypokalaemia of renal origin suggesting Gitelman syndrome. **Eur J Endocrinol**, v. 165, n. 4, p. 665-73, Oct 2011. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21753071> >.

BECKER, D. et al. New alleles and mutational events at 14 STR loci from different German populations. **Forensic Sci Int Genet**, v. 1, n. 3-4, p. 232-7, Dec 2007. ISSN 1878-0326. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19083767 >.

BERRY, M. R.; ROBINSON, C.; KARET FRANKL, F. E. Unexpected clinical sequelae of Gitelman syndrome: hypertension in adulthood is common and females have higher potassium requirements. **Nephrol Dial Transplant**, v. 28, n. 6, p. 1533-42, Jun 2013. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328711> >.

BETTINELLI, A. et al. Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primary renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes. **J Pediatr**, v. 120, n. 1, p. 38-43, Jan 1992. ISSN 0022-3476. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1731022> >.

_____. Genotype-phenotype correlations in normotensive patients with primary renal tubular hypokalemic metabolic alkalosis. **J Nephrol**, v. 11, n. 2, p. 61-9, 1998 Mar-Apr 1998. ISSN 1121-8428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9589375> >.

BIRKENHÄGER, R. et al. Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. **Nat Genet**, v. 29, n. 3, p. 310-4, Nov 2001. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687798> >.

CHADWICK, R. B. et al. Heterozygote and mutation detection by direct automated fluorescent DNA sequencing using a mutant Taq DNA polymerase. **Biotechniques**, v. 20, n. 4, p. 676-83, Apr 1996. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8800689> >.

CHENG, N. et al. Novel thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter mutation in a Chinese patient with Gitelman's syndrome presenting as hypokalaemic paralysis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 5, p. 1005-8, May 2003. ISSN 0931-0509. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12686679 >.

CLIVE, D. M. Bartter's syndrome: the unsolved puzzle. **Am J Kidney Dis**, v. 25, n. 6, p. 813-23, Jun 1995. ISSN 0272-6386. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7771476> >.

COLOMBO, R. Age estimate of the N370S mutation causing Gaucher disease in Ashkenazi Jews and European populations: A reappraisal of haplotype data. **Am J Hum Genet**, v. 66, n. 2, p. 692-7, Feb 2000. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677327> >.

COTO, E. et al. A new mutation (intron 9 +1 G>T) in the SLC12A3 gene is linked to Gitelman syndrome in Gypsies. **Kidney Int**, v. 65, n. 1, p. 25-9, Jan 2004. ISSN 0085-2538. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14675033 >.

CRUZ, D. N. et al. Gitelman's syndrome revisited: an evaluation of symptoms and health-related quality of life. **Kidney Int**, v. 59, n. 2, p. 710-7, Feb 2001. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11168953> >.

DE JONG, J. et al. Functional expression of mutations in the human NaCl cotransporter: evidence for impaired routing mechanisms in Gitelman's

syndrome. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 6, p. 1442-8, Jun 2002. ISSN 1046-6673. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12039972>.

DERST, C. et al. Mutations in the ROMK gene in antenatal Bartter syndrome are associated with impaired K⁺ channel function. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 230, n. 3, p. 641-5, Jan 1997. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9015377>>.

DIB, C. et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. **Nature**, v. 380, n. 6570, p. 152-4, Mar 1996. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8600387>>.

FANCONI, A. et al. Chronic hypokalaemia with growth retardation, normotensive hyperrenin-hyperaldosteronism ("Bartter's syndrome"), and hypercalciuria. Report of two cases with emphasis on natural history and on catch-up growth during treatment. **Helv Paediatr Acta**, v. 26, n. 2, p. 144-63, Jun 1971. ISSN 0018-022X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5139245>>.

FAVA, C. et al. Subjects heterozygous for genetic loss of function of the thiazide-sensitive cotransporter have reduced blood pressure. **Hum Mol Genet**, v. 17, n. 3, p. 413-8, Feb 2008. ISSN 1460-2083. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17981812>.

_____. Novel mutations in the SLC12A3 gene causing Gitelman's syndrome in Swedes. **DNA Seq**, v. 18, n. 5, p. 395-9, Oct 2007. ISSN 1042-5179. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17654016>.

FISCHER, M.; JANSSEN, A. G.; FAHLKE, C. Barttin activates ClC-K channel function by modulating gating. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, n. 8, p. 1281-9, Aug 2010. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20538786> >.

FULLERTON, S. M. et al. The effects of scale: variation in the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster. **Hum Genet**, v. 115, n. 1, p. 36-56, Jun 2004. ISSN 0340-6717. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15108119> >.

GARCÍA PÉREZ, A. et al. [Compound heterozygosis for intron 9 + 1 g > T and Leu850pro mutations in the SLC12A3 gene in Gitelman's syndrome]. **Nefrologia**, v. 28, n. 6, p. 659-60, 2008. ISSN 0211-6995. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19016647 >.

GITELMAN, H. J.; GRAHAM, J. B.; WELT, L. G. A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. **Trans Assoc Am Physicians**, v. 79, p. 221-35, 1966. ISSN 0066-9458. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5929460> >.

GLAUDEMANS, B. et al. Novel NCC mutants and functional analysis in a new cohort of patients with Gitelman syndrome. **Eur J Hum Genet**, v. 20, n. 3, p. 263-70, Mar 2012. ISSN 1476-5438. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009145> >.

GORGÓJO, J. et al. A Spanish founder mutation in the chloride channel gene, CLCNKB, as a cause of atypical Bartter syndrome in adult age. **Horm Res**, v. 65, n. 2, p. 62-8, 2006. ISSN 0301-0163. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16391491 >.

GREGER, R. **Renale Wirkmechanismen der Diuretika** Nieren- und Hochdruckkrankheiten: 136-146 p. 1996.

HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. ISSN 3.

JECK, N. et al. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype. **Pediatr Res**, v. 48, n. 6, p. 754-8, Dec 2000. ISSN 0031-3998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102542> >.

_____. Hypokalemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness. **Pediatrics**, v. 108, n. 1, p. E5, Jul 2001. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433084> >.

JI, W. et al. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. **Nat Genet**, v. 40, n. 5, p. 592-9, May 2008. ISSN 1546-1718. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18391953 >.

KNOERS, N. V.; LEVTCHENKO, E. N. Gitelman syndrome. **Orphanet J Rare Dis**, v. 3, p. 22, 2008. ISSN 1750-1172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18667063> >.

KONG, X.; MATISE, T. C. MAP-O-MAT: internet-based linkage mapping. **Bioinformatics**, v. 21, n. 4, p. 557-9, Feb 2005. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15374870> >.

KONG, X. et al. A combined linkage-physical map of the human genome. **Am J Hum Genet**, v. 75, n. 6, p. 1143-8, Dec 2004. ISSN 0002-9297. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15486828 >.

KURTZ, C. et al. A common NKCC2 mutation in Costa Rican Bartter's syndrome patients: evidence for a founder effect. **J Am Soc Nephrol**, v. 8, n. 11, p. 1706-11, Nov 1997. ISSN 1046-6673. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9355073 >.

LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; GUJER-KELLENBERGER, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. **J Mol Biol**, v. 47, n. 1, p. 69-85, Jan 1970. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5413343> >.

LEMMINK, H. et al. Linkage of Gitelman syndrome to the thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter gene with identification of mutations in Dutch families. **Pediatr Nephrol**, v. 10, n. 4, p. 403-7, Aug 1996. ISSN 0931-041X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8865231 >.

LEMMINK, H. H. et al. Novel mutations in the thiazide-sensitive NaCl cotransporter gene in patients with Gitelman syndrome with predominant localization to the C-terminal domain. **Kidney Int**, v. 54, n. 3, p. 720-30, Sep 1998. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9734597> >.

LEONHARDT, A. et al. Calcium homeostasis and hypercalciuria in hyperprostaglandin E syndrome. **J Pediatr**, v. 120, n. 4 Pt 1, p. 546-54, Apr 1992. ISSN 0022-3476. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1340758> >.

LIN, S. et al. Intrafamilial phenotype variability in patients with Gitelman syndrome having the same mutations in their thiazide-sensitive sodium/chloride cotransporter. **Am J Kidney Dis**, v. 43, n. 2, p. 304-12, Feb 2004. ISSN 1523-6838. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14750096 >.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am J Hum Genet**, v. 44, n. 3, p. 397-401, Mar 1989. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2563634> >.

LO, Y. F. et al. Recurrent deep intronic mutations in the SLC12A3 gene responsible for Gitelman's syndrome. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 6, n. 3, p. 630-9, Mar 2011. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051746> >.

MACKIE, F. E. et al. Neonatal Bartter syndrome--use of indomethacin in the newborn period and prevention of growth failure. **Pediatr Nephrol**, v. 10, n. 6, p. 756-8, Dec 1996. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8971899> >.

MAKI, N. et al. Four novel mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl co-transporter gene in Japanese patients with Gitelman's syndrome. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, n. 7, p. 1761-6, Jul 2004. ISSN 0931-0509. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15069170 >.

MASTROIANNI, N. et al. Novel molecular variants of the Na-Cl cotransporter gene are responsible for Gitelman syndrome. **Am J Hum Genet**, v. 59, n. 5, p. 1019-26, Nov 1996. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900229> >.

MCCREDIE, D. A.; ROTENBERG, E.; WILLIAMS, A. L. Hypercalciuria in potassium-losing nephropathy: a variant of Bartter's syndrome. **Aust Paediatr J**, v. 10, n. 5, p. 286-95, Oct 1974. ISSN 0004-993X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4447519> >.

MESELSON, M. S.; RADDING, C. M. A general model for genetic recombination. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 1, p. 358-61, Jan 1975. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1054510> >.

MONKAWA, T. et al. Novel mutations in thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter gene of patients with Gitelman's syndrome. **J Am Soc Nephrol**, v. 11, n. 1, p. 65-70, Jan 2000. ISSN 1046-6673. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10616841 >.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 155, p. 335-50, 1987. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3431465> >.

MURRAY, J. C. et al. A comprehensive human linkage map with centimorgan density. Cooperative Human Linkage Center (CHLC). **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2049-54, Sep 1994. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8091227> >.

NAKHOUL, F. et al. Gitelman's syndrome: a pathophysiological and clinical update. **Endocrine**, v. 41, n. 1, p. 53-7, Feb 2012a. ISSN 1559-0100. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22169961> >.

_____. Gitelman's syndrome: a pathophysiological and clinical update. **Endocrine**, v. 41, n. 1, p. 53-7, Feb 2012b. ISSN 1559-0100. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22169961> >.

NEWTON, C. R. et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Res**, v. 17, n. 7, p. 2503-16, Apr 1989. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2785681> >.

NIJENHUIS, T. et al. Enhanced passive Ca²⁺ reabsorption and reduced Mg²⁺ channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. **J Clin Invest**, v. 115, n. 6, p. 1651-8, Jun 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15902302> >.

ORITA, M. et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 8, p. 2766-70, Apr 1989. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2565038 >.

RIVEIRA-MUNOZ, E. et al. Gitelman's syndrome: towards genotype-phenotype correlations? **Pediatr Nephrol**, v. 22, n. 3, p. 326-32, Mar 2007. ISSN 0931-041X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17061123 >.

_____. Transcriptional and functional analyses of SLC12A3 mutations: new clues for the pathogenesis of Gitelman syndrome. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 4, p. 1271-83, Apr 2007. ISSN 1046-6673. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17329572 >.

RODRÍGUEZ-SORIANO, J. et al. A founder mutation in the CLCNKB gene causes Bartter syndrome type III in Spain. **Pediatr Nephrol**, v. 20, n. 7, p. 891-6, Jul 2005. ISSN 0931-041X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15875219 >.

RUDIN, A.; SJÖGREN, B.; AURELL, M. Low urinary calcium excretion in Bartter's syndrome. **N Engl J Med**, v. 310, n. 18, p. 1190, May 1984. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6709017> >.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, Dec 1977. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968> >.

SCHOUTEN, J. P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 12, p. e57, Jun 2002. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060695> >.

SEIDEL, C. et al. Pre-pubertal growth in the hyperprostaglandin E syndrome. **Pediatr Nephrol**, v. 9, n. 6, p. 723-8, Dec 1995. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8747113> >.

SEYBERTH, H.; SOERGEL, M.; KÖCKERLING, A. **Hypokalaemic tubular disorders: the hyperprostaglandine E syndrome and Bartter-Gitelman syndrome**. Oxford Univer 1998.

SEYBERTH, H. W. et al. Congenital hypokalemia with hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome. **J Pediatr**, v. 107, n. 5, p. 694-701, Nov 1985. ISSN 0022-3476. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3863906> >.

SHAO, L. et al. Novel SLC12A3 mutations in Chinese patients with Gitelman's syndrome. **Nephron Physiol**, v. 108, n. 3, p. p29-36, 2008. ISSN 1660-2137. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18287808 >.

SHOEMAKER, L. et al. Calcium kinetics in the hyperprostaglandin E syndrome. **Pediatr Res**, v. 33, n. 1, p. 92-6, Jan 1993. ISSN 0031-3998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8433868> >.

SIMON, D.; LIFTON, R. The molecular basis of inherited hypokalemic alkalosis: Bartter's and Gitelman's syndromes. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 2, p. F961-6, Nov 1996. ISSN 0002-9513. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8945989 >.

SIMON, D. et al. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. **Nat Genet**, v. 12, n. 1, p. 24-30, Jan 1996. ISSN 1061-4036. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8528245 >.

SIMON, D. B. et al. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. **Nat Genet**, v. 17, n. 2, p. 171-8, Oct 1997. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326936> >.

_____. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. **Nat Genet**, v. 14, n. 2, p. 152-6, Oct 1996. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8841184> >.

SYRÉN, M. et al. Identification of fifteen novel mutations in the SLC12A3 gene encoding the Na-Cl Co-transporter in Italian patients with Gitelman syndrome. **Hum Mutat**, v. 20, n. 1, p. 78, Jul 2002. ISSN 1098-1004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12112667 >.

URBANOVÁ, M. et al. Genetic analysis of Gitelman syndrome patients from the Czech Republic and Slovakia--three novel mutations found. **Kidney Blood Press Res**, v. 29, n. 6, p. 360-5, 2006. ISSN 1420-4096. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17159356> >.

VARGAS-POUSSOU, R. et al. Spectrum of mutations in Gitelman syndrome. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 4, p. 693-703, Apr 2011. ISSN 1533-3450.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415153> >.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am J Hum Genet**, v. 44, n.

3, p. 388-96, Mar 1989. ISSN 0002-9297. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2916582> >.

WEBER, S. et al. Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. **J Am Soc**

Nephrol, v. 12, n. 9, p. 1872-81, Sep 2001. ISSN 1046-6673. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518780> >.

WHITE, T. J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H. A. The polymerase chain reaction.

Trends Genet, v. 5, n. 6, p. 185-9, Jun 1989. ISSN 0168-9525. Disponível em:

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2672459> >.

YANG, T. et al. Localization of bumetanide- and thiazide-sensitive Na-K-Cl

cotransporters along the rat nephron. **Am J Physiol**, v. 271, n. 4 Pt 2, p. F931-

9, Oct 1996. ISSN 0002-9513. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898025> >.

8 Anhang

8.1 Mutationsübersicht

Tabelle 14: Mutationsübersicht aller Mutationen des gesamten Patientenkollektivs außer G741R, G439S, C994Y, IVS24(+1)G>T und L859P

Mutation	HGM-Code
M1V	nicht in HGMD gelistet
A13P	rs147200024
S126fs	nicht in HGMD gelistet
R158P	nicht in HGMD gelistet
R158Q	CM021326
S178L	CM014394
G202V	nicht in HGMD gelistet
R209Q	CM014395
L215P	CM981826
A224D	CM088270
I253fs	nicht in HGMD gelistet
R261H	CM981828
L272P	CM088279
R321W	CM014398
A356V	CM088275
T382M	CM088242
R399C	CM014400
S402fs	nicht in HGMD gelistet
G463R	CM116327
N526S	nicht in HGMD gelistet
L542P	CM961292
I580fs	CD117006
S614P	CM116189
R642H	CM088255
R642C	CM993210
Q644fs	CD044805

R655C	CM981832
P656L	CM117061
P687fs	nicht in HGMD gelistet
G729V	CM014406
G731R	CM961299
L738R	CM981833
S833T	CM121312
G876S	CM076520
L891fs	nicht in HGMD gelistet
R896Q	CM033815
L905F	nicht in HGMD gelistet
W948*	nicht in HGMD gelistet
954delE	nicht in HGMD gelistet
T1026I	CM088265
IVS5(+1)G>A	CS033840
IVS14(+1)G>C	nicht in HGMD gelistet
IVS24(+1)G>A	nicht in HGMD gelistet

8.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
aBS	antenatales Bartter-Syndrom
ARMS-PCR	Amplification-refractory-mutation-system-polymerase chain reaction
bp	Basenpaare
BS	Bartter-Syndrom
BSND	Bartter-Syndrom mit Taubheit
Ca ²⁺	Kalzium
cBS	klassisches Bartter-Syndrom
CEPH	Centre d'Etude du Polymorphisme Humain
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cl ⁻	Chlorid
CLCNKB	Chloridkanal Kb
cM	Centimorgan
DCT	distal convoluted tubule (engl., = distales Konvolut)
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	deoxyribonucleic acid (engl., = Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	epithelialer Natriumkanal
GLP	Gel-Lade-Puffer
GS	Gitelman-Syndrom
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HPS	Hyperprostaglandin-E-Syndrom
HGMD	human gene mutation database
htSNP	haplotype tagging-single nucleotide polymorphism
K ⁺	Kalium

kb	Kilo-Basenpaare
L	Liter
M	Mol
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minuten
ml	Milliliter
MLPA	multiplex-ligation-dependent probe amplification (engl., = mehrschichtige ligationsabhängige Sondenamplifikation)
mm	Millimeter
MQ	Mittelwasser
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NCCT	Natrium-Chlorid-Cotransporter
ng	Nanogramm
NKCC2	Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter
nm	Nanometer
p.a.	pro analysi
PCR	polymerase chain reaction (engl., = Polymerasekettenreaktion)
RAAS	Renin-Angiotension-Aldosteron-System
RNA	ribonucleic acid (engl., = Ribonukleinsäure)
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium Channel (engl., = Kaliumkanal des äußeren Nierenmarks)
sek	Sekunden
SNP	single nucleotide polymorphism (engl., = Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SSCP	Single strand confirmation polymorphism (engl., = Einzelstrang-Konfirmations-Polymorphismus-Analyse)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	thick ascending limb

	(engl., = dicker aufsteigender Teil)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
V	Volt
W	Watt
μl	Mikroliter

8.3 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SALZRESORPTION ENTLANG DES NEPHRONS UND IM DISTALEN KONVOLUT (DCT)	17
ABBILDUNG 2: STRUKTUR DES SLC12A3-GENS	18
ABBILDUNG 3: NACHWEIS EINES FOUNDEREFFEKTS AM BEISPIEL DES <i>CLDN16</i> -GENS BEI PATIENTEN MIT PCLN-1 MUTATION L151P (WEBER <i>ET AL.</i> , 2001).....	21
ABBILDUNG 4: PCR-AGAROSEGEL NACH ETHIDIUMBROMIDFÄRBUNG.....	30
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	32
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ARMS-PCR ZUR SNP-ANALYSE.....	34
ABBILDUNG 7: REKOMBINATION (R) UND NICHT-REKOMBINATION (NR) - VIER VERSCHIEDENE MÖGLICHKEITEN DER GAMETENBILDUNG	37
ABBILDUNG 8: ANORDNUNG DER SNPs INNERHALB DES GENs.....	39
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FUNKTIONSPRINZIPS DER SSCP-ANALYSE.....	43
ABBILDUNG 10: SSCP-AUSWERTUNG.....	47
ABBILDUNG 11: SNP-ANALYSE VON 5 SNPs IM SLC12A3-GEN.....	52
ABBILDUNG 12: HAPLOTYPENANALYSE BEI MUTATIONSTRÄGERN VON G741R, G439S, C994Y, IVS24(+1)G>T, L859P: MIT G741R, G439S, C994Y, IVS24(+1)G>T UND L859P	54

8.4 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: KLINISCHE SYMPTOMATIK UND BIOCHEMISCHE KONSTELLATION VON ABS, CBS, BSND UND GS IM VERGLEICH	11
TABELLE 2: GEGENÜBERSTELLUNG DETEKTIERTER MUTIERTER ALLELE UND VERSCHIEDENER MUTATIONEN VON DREI GROßEN STUDIEN DER LETZTEN JAHRE	12
TABELLE 3: VERANTWORTLICHE GENE, RESULTIERENDE TRANSPORTPROTEINE , DEREN LOKALISATION UND FUNKTION DES ABS, CBS, BSND UND GS	17
TABELLE 4: PATIENTENKOLLEKTIV MIT ENTSPRECHENDEN MUTATIONEN.....	23
TABELLE 5: SEQUENZEN DER PRIMER FÜR DIE ALLELSPEZIFISCHEN ARMS-PCRs ...	44
TABELLE 6: MUTATIONSASSOZIIERTE HAPLOTYPEN DER FÜNF UNTERSUCHTEN MUTATIONEN G741R, G439S, C994Y, IVS24(+1)G>T, L859P	53
TABELLE 7: MIKROSATELLITENANALYSE BEI TRÄGERN DER G741R MUTATION IM VERGLEICH ZU 51 GESUNDEN KONTROLLPERSONEN	56
TABELLE 8: MIKROSATELLITENANALYSE BEI TRÄGERN DER G439S MUTATION IM VERGLEICH ZU 51 GESUNDEN KONTROLLPERSONEN	56
TABELLE 9: MIKROSATELLITENANALYSE BEI TRÄGERN DER C994Y MUTATION IM VERGLEICH ZU 51 GESUNDEN KONTROLLPERSONEN	56
TABELLE 10: MIKROSATELLITENANALYSE BEI TRÄGERN DER IVS24(+1)G>T MUTATION IM VERGLEICH ZU 51 GESUNDEN KONTROLLPERSONEN	57
TABELLE 11: MIKROSATELLITENANALYSE BEI TRÄGERN DER L859P MUTATION IM VERGLEICH ZU 51 GESUNDEN KONTROLLPERSONEN	57
TABELLE 12: VERGLEICH DER PROZENTUALEN HÄUFIGKEIT DER ALLELTRÄGER EINER DER FÜNF UNTERSUCHTEN MUTATIONEN MIT DER KOHORTE VON JI ET AL. 2008 (JI ET AL., 2008).....	60
TABELLE 13: HÄUFIGKEIT DER FÜNF UNTERSUCHTEN MUTATIONEN IN EXAC.....	64
TABELLE 14: MUTATIONSÜBERSICHT ALLER MUTATIONEN DES GESAMTEN PATIENTENKOLLEKTIVS AUßER G741R, G439S, C994Y, IVS24(+1)G>T UND L859P	81

8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Greifswald waren die Damen und Herren:

Prof. Dr. Hannich	Prof. Dr. Wehnert
Prof. Dr. Fanghänel	Prof. Dr. Kramer
Priv.-Doz. Dr. Gadebusch Bondio	

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Prof. Dr. Aumüller	Prof. Dr. Maier
Prof. Dr. Barth	Prof. Dr. Maisch
Prof. Dr. Bartsch	Priv.-Doz. Dr. Maisner
Prof. Dr. Baum	Priv.-Doz. Dr. Martin
Prof. Dr. Dr. Basler	Prof. Dr. Moll
Prof. Dr. Bien	Prof. Dr. Moosdorf
Prof. Dr. Cetin	Prof. Dr. Mutters
Prof. Dr. Czubayko	Prof. Dr. Neubauer
Prof. Dr. Daut	Prof. Dr. Neumüller
Prof. Dr. Dr. Mueller	Prof. Dr. Oertel
Prof. Dr. Fuchs-Winkelmann	Prof. Dr. Pagenstecher
Prof. Dr. Gerdes	Priv.-Doz. Dr. Printz
Prof. Dr. Görg	Prof. Dr. Renz
Prof. Dr. Gress	Prof. Dr. Richter
Prof. Dr. Grzeschick	Prof. Dr. Riße
Prof. Dr. Herrmann-Lingen	Prof. Dr. Röper
Prof. Dr. Hertl	Prof. Dr. Rothmund
Prof. Dr. Hoyer	Prof. Dr. Ruchholtz
Prof. Dr. Dr. Kann	Prof. Dr. Schäfer
Prof. Dr. Klaus	Prof. Dr. Schrader
Prof. Dr. Klingmüller	Prof. Dr. Sesterhenn
Prof. Dr. Klose	Prof. Dr. Steininger
Prof. Dr. Koolman	Prof. Dr. Tibesku
Prof. Dr. Krieg	Prof. Dr. Vogelmeier

Prof. Dr. Kroll
Prof. Dr. Lang
Prof. Dr. Lohoff
Prof. Dr. Maier
Prof. Dr. Maisch

Prof. Dr. Wagner
Prof. Dr. Waldegger
Prof. Dr. Weihe
Prof. Dr. Werner
Prof. Dr. Wulf

8.6 Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich meinem Betreuer für diese Arbeit, Priv.-Doz. Dr. Karl-Peter Schlingmann, ausdrücken. Ich verdanke ihm zu jeder Zeit viele konstruktive Diskussionen und intensive Hilfestellungen bereits mit Beginn des experimentellen Teils dieser Arbeit bis zur Verschriftlichung des Projekts.

Herrn Prof. Dr. Günter Klaus möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung in seiner Arbeitsgruppe und den Forschungslaboren danken.

Einen großen Dank möchte ich auch an Prof. Dr. Rolf. F. Maier richten. Ich hatte während der Erstellung dieser Arbeit in Famulaturen und dem Wahl-Tertial meines Praktischen Jahres in der Kinderklinik die Möglichkeit, viele Fähigkeiten zu erwerben, die mir bei meiner heutigen Tätigkeit weiterhin oft hilfreich sind.

Für die vielen aufbauenden und warmherzigen Gespräche und Anregungen möchte ich mich ganz besonders auch bei Regina Stöhr (LTA) und Sabine Jennemann (MTA) aus der benachbarten Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Michael Zemlin bedanken. Es war mir eine große Freude mit Euch ein Labor zu teilen.

Für die professionelle Einführung in alle für mich neu zu erlernenden labortechnischen Prozesse danke ich Frau Alexandra Wagner (MTA) ganz herzlich. Sie hat mich jederzeit tatkräftig unterstützt und geholfen spezielle Probleme mit der Methodik zu beheben.

Auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin an der Uniklinik Marburg möchte ich, für alles was ich bei Ihnen/Euch lernen durfte, meinen Dank aussprechen.

Außerdem geht mein Dank auch an die Mitglieder der Verwaltung des Fachbereichs, insbesondere Frau Heidrun Wittkowsky, die mir viele organisatorische Fragen schnell, unkompliziert und hilfreich beantwortete.

Meine Eltern, Barbara und Hans-Jürgen Swoboda, haben mir nicht nur das Studium der Humanmedizin ermöglicht, sondern vor allem immer liebevolle und unterstützende Worte gefunden und damit die Grundvoraussetzung geboten, dass diese Arbeit entstehen konnte. Es ist wunderbar zu wissen, dass Ihr mir in jeder Lebenslage zur Seite steht. Ich bin sehr glücklich und froh, dass wir einen so einzigartigen Familienzusammenhalt haben.

Ganz lieben Dank möchte ich auch meinem Bruder, Marlon Swoboda, aussprechen. Auch unsere brüderliche Freundschaft ist einzigartig bedeutungsvoll für mich.

Aus ganzem Herzen möchte ich mich auch bei meiner Freundin, Lena Sellmann, bedanken. Sie hat mir jederzeit geduldig, fürsorglich und liebevoll jegliche Unterstützung zu Teil werden lassen. Dafür bin ich sehr dankbar.

Meinem allerbesten Freund, David Santoni, möchte ich von Herzen für alles danken! Danke, dass ich immer auf Dich zählen kann.

Des weiteren möchte ich Constanze Hoffmann meinen herzlichen Dank für die Zeit und Mühe, die sie in die Korrektur der Form und Rechtschreibung dieser Arbeit investiert hat, aussprechen.